THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Sciences pour l'Ingénieur – Biotechnologie et Microbiologie

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche Sciences pour l'œnologie, INRA Montpellier
Laboratoire MicroBioTech, ONIRIS Nantes

Dispersion, sélection et rôle des espèces microbiennes des levains en boulangerie française à faible intrant

Présentée par Elisa MICHEL
Le 22 novembre 2018

Sous la direction de Delphine SICARD

Devant le jury composé de

Marie-Christine CHAMPOMIER-VERGES, Directrice de Recherche, INRA, France	Présidente du jury
Marco GOBBETTI, Full Professor, Free University of Bolzano, Italy	Rapporteur
Warren ALBERTIN, Maître de Conférences, ENSCBP, Bordeaux INP, France	Examinatrice
Sylvie BLANGY, Ingénieur de recherche, CEFE/CNRS, France	Examinatrice
Hélène CHAUDY, Paysanne Boulangère, Ferme d'Orvilliers	Invitée
Bernard ONNO, Maître de Conférences, ONIRIS	Encadrant de thèse
Delphine SICARD, Directrice de Recherche, INRA, France	Directrice de thèse

Montpellier SupAgro

Oniris
École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation
Nantes Atlantique
Santé et alimentation au cœur de la vie

Dispersion, sélection et rôle des espèces microbiennes des levains en boulangerie française à faible intrant

Le pain a une importance historique et culturelle en France. Or, la diversité des pratiques des boulangers français n'a jamais été décrite ni reliée à la biodiversité. L'industrialisation du 20ème siècle a promu l'utilisation de levure starters et la standardisation. Considérant des enjeux sociétaux et environnementaux, des paysans-boulangers et des boulangers utilisent maintenant le levain comme agent de pousse, une pâte naturellement fermentée composée de farine, d'eau, de bactéries et de levures. L'objectif de mon doctorat était i) de caractériser la diversité microbienne des levains et d'analyser les facteurs la structurant, ii) de suivre la dispersion et la sélection des espèces microbiennes de la graine au pain, iii) de tester l'effet du terroir, des variétés de blé et du levain sur les propriétés nutritionnelles et organoleptiques du pain. Cette recherche a émergé d'une construction participative par des boulangers, des paysans et des scientifiques. Nous avons montré que la France héberge une grande diversité d'espèces microbiennes. Deux grands groupes de pratiques, boulangers et paysans-boulangers, structurent la diversité d'espèces de levures. L'espèce bactérienne dominante semble issue de la farine, la levure de l'environnement levain. La dynamique de sélection au cours des rafraîchis diffèrent pour les bactéries et les levures. La qualité de pain résulte d'interactions entre le levain, les variétés de blé et le terroir. Globalement, nos résultats soulignent le rôle des pratiques agronomiques et boulangères à chaque étape de la chaîne et documentent le rôle de la domestication dans la dispersion et la sélection de la diversité d'espèce microbienne.

Mots-clés : boulangerie, recherche participative, écologie microbienne, levain, bactéries lactiques, levures, domestication des microorganismes, paysans-boulangers, boulangers

---

Dispersion, selection and effect of sourdough microbial species in low-input French bakery

Bread has a historical and cultural importance in France. However, the diversity of the French bakers' practices was never described and linked to the biodiversity. During the 20th century, industrialization promoted the use of yeast starters and standardized processes. However, becoming more aware of global changes, some farmers-bakers and bakers now use sourdough as a fermenting agent, a naturally fermented dough composed of flour, water, bacteria and yeasts. The goal of my PhD was a) to characterize their sourdough microbial species diversity and to analyse its structuring factors, b) to follow the microbial species dispersion and selection from seed to bread, and c) to test the terroir, wheat variety type and sourdough effects on bread's nutritional and organoleptic properties. This research emerged from a participatory co-construction by bakers, farmers and scientists. We showed that France hosts a wide species diversity in sourdough. Two main groups of practices, the baker and farmer-baker like practices, structured the yeast species diversity. The dominant bacterium seems to come from the flour while yeast dominant species seems to come from the house microbiota. The dynamic of selection over backsloppings differed for bacteria and yeasts. The bread quality results from the interaction between the sourdough, the wheat varieties and the wheat terroir. Overall, our results highlight the role of agronomic and bakery practices on each step of the chain and documented the role of domestication in the dispersion and selection of microbial species diversity.

Keywords: bakery, participative research, microbial ecology, sourdough, lactic acid bacteria, yeasts, microbial domestication, farmers-bakers, bakers

Remerciements

Cette thèse est le fruit de nombreuses collaborations. Cela a été trois ans de voyages, de rencontres, de discussions formelles et informelles, de sciences, de paillasse, de fournils, de bons pains et de joie. Au gré des expériences scientifiques, au nom de la recherche participative, j'ai vogué par monts et par vaux et je tiens à remercier de nombreuses personnes.

Tout d'abord, un immense merci à mes encadrants de thèse, à ma directrice de thèse **Delphine** Sicard, à **Bernard** Onno et **Xavier** Dousset pour vos connaissances techniques et scientifiques qui m'ont portées au long de ces années. Merci de votre immense confiance en mon travail et en moi, de votre écoute et de votre accompagnement.

Merci à **Marie-Christine Champomier Vergès** d'avoir présidé le jury, à Pr. **Marco Gobbetti**, **Warren Albertin** et **Sylvie Blangy** à d'avoir accepté de relire mon travail,. Merci à **Hélène Chaudy** pour sa présence en qualité d'invitée.

Merci à mon comité de thèse, **Judith Legrand**, **Aymé Spor**, **Sylvie Dequin** et mon tuteur de l'école doctorale GAIA **Didier Montet**, pour l'intérêt porté à mon travail et leurs conseils avisés.

Un immense merci à l'équipe nantaise du LMAI au sein de l'école ONIRIS qui m'a accueilli pour ma première année de thèse où j'ai compris que « j'allais avoir du pain sur la planche » ! Merci à **Isabelle** Hue, **Margaret** Guilbot et **Sylvie** Cabon pour votre soutien technique, à **Martine** Lebois pour la gestion administrative, à **Emmanuel** Jaffrès, **Nabila** Haddad, **Hervé** Prévost et **Bénédicte** Sorin pour vos conseils scientifiques. Merci à ma co-doctorante de l'unité **Héliciane** Clément, à **Marion** Deffrasnes pour son aide précieuse, ses blagues, à **Marie** Brossier pour nos échanges, MICADO et enfin à ma stagiaire **Héloïse** Debroise sans qui la gestion de notre grosse expérience de thèse n'aurait été possible. Merci également à **Monique** Zagorec pour le soutien au cours de cette première année et **Agnès** Bouju pour l'aide technique à Sécalim.

Un grand merci à l'équipe montpelliéraine ADEL de l'UMR SPO de l'INRA, qui m'a accueilli pour ma deuxième et troisième année de thèse. Merci infiniment à la team Bakery, **Stéphane** Guézenec pour son aide et pour ses conseils techniques avisés, mon stagiaire **Julien** Lebrat pour les incalculables extractions d'ADN, les post-doctorants **Johan** Ramsayer et **Belen** Carbonetto pour leur sympathie et les discussions effervescentes. Merci à **Sandrine** Mallet pour son aide précieuse en biologie moléculaire et son dynamisme, à **Thibault** Nidelet pour les discussions formelles et informelles en statistiques, R, représentations graphiques, potins et à **Jean-Luc** Legras pour les nombreuses discussions pertinentes sur les levures. Merci à **Agnès** Ageorges, nouvelle convertie au projet Bakery et à **Agnès** Masquin pour la gestion administrative de tous nos trajets fous. Merci à **Virginie** Galéote pour les discussions et les moments partagés au Salon de l'Agriculture et à **Virginie** Hugouvieux pour l'automatisation des scripts. Un merci à **Fréderic** Bigey pour sa grande aide dans l'aventure de la bio-informatique. Merci à vous tous pour votre intérêt pour ma thèse et pour votre soutien au quotidien. Merci à **Peggy** Rigou, **Emmanuelle** Meudec, **Valérie** Nolleau et **Adeline** André pour l'aide sur les composés volatiles. Merci aux doctorants **Noémie** Fayeulle, **Sonia** Boudaoud, **Elissa** El-Habib, **Irene** De Guidi, **Carmen** Rodriguez-Becerra, **Valeriia** Karaseva, **Coline** Leriche, **Amandine** Deroite, **Matthias** Eder et **David** Ferreira, aux stagiaires **Giovana** Piva Girardi et **Estefania** Ortega pour ces deux années montpelliéraines.

Je remercie tous les partenaires impliqués dans le projet ANR BAKERY, pour les nombreux échanges, rencontres au fournil et conseils. Merci à **Simon** Rousselot, **Véronique** Chable, **Antoine** Marin de l'INRA du Rheu et **Estelle** Serpolay-Besson de l'ITAB au Rheu pour leurs conseils en agriculture biologique, les semences, le triage des graines au début de ma thèse dans une ferme bretonne et leur accueil dans la quarantaine. Merci de m'avoir permis de présenter mes travaux avec le GABB du Maine-et-Loire et en Belgique à l'occasion d'un congrès sur les semences paysannes. Merci à **Marie-Noëlle** Madec et **Florence** Valence-Bertel de STLO de l'INRA de Rennes pour leur gentillesse et leur patience pour la collection des bactéries lactiques. Merci à **Estelle** Masson, **Sandrine** Bubbendorf et **Léocadie** Fayos pour les échanges bienveillants et l'analyse des représentations sociales du pain qui ont éclairé mon discours et ma thèse. Merci à **Isabelle** Goldringer de l'INRA du Moulon pour ses conseils lors des colloques BAKERY et à **Serge** Casaregola pour les conseils sur la taxonomie des levures. Merci à **Camille** Vindras et à **Bruno** Taupier-Letage de l'ITAB pour les échanges sur les analyses sensorielles, données nutritionnelles du pain et conseils sur la thèse. Merci au Réseau Semences Paysannes (**RSP**) pour les valeurs qu'il porte et son implication dans le projet. Le projet BAKERY ne serait rien sans nos boulangers et paysans. Merci aux agriculteurs du projet, **Florent** Mercier, **Gilles** Simonneaux, **Laurent** Marteau et le **Lycée Agricole du Rheu**. Un immense merci à **Hélène** Simon, **Lili** Moyses, **Xavier** Dell'armi, **Michel** Perrin pour l'accueil généreux et altruistes dans vos fournils. Merci à tous ceux qui m'ont conseillé, **Nicolas** Supiot, **Jean-François** Berthellot, **Anna** et **Maximilien**, **Françoise** et **Alain** Bourgeois, **Mary** et **Loulou**, **Cécile** Dubart, **Benoit** Cassan, **Pascal** Leguern et bien d'autres…

J'adresse un immense merci à **Judith** Legrand pour son aide précieuse en mathématiques et modélisation, pour le temps qu'elle a passé pour me conseiller. Merci à **Philippe** Roussel de Triptolème et **Hubert** Chiron de l'INRA de Nantes pour la panification et vos connaissances incroyables sur le pain. Un grand merci à **Olivier** Rué pour son grand investissement dans ma thèse, sa gentillesse, son écoute et surtout son aide précieuse pour les analyses bio-informatiques. Merci à l'équipe Emersys de l'INRA d'Angers, particulièrement à **Matthieu** Barret pour l'accueil pour nos séquençages MiSeq, son écoute, et à **Perrine** Portier pour son accueil, nos échanges et nos tisanes. Merci à **Matthieu** Thomas pour sa gentillesse et ses conseils, **Florentin** Constencias pour les apports en écologie microbienne, **Sylvain** Santoni pour notre collaboration dans la deuxième partie des séquençages MiSeq et **Marie-Hélène** Morel pour les analyses de gluten.

J'adresse un immense merci à mes amis nombreux qui m'ont soutenu et qui ont égayé cette thèse. La liste est longue, pardon ne pas pouvoir tous vous citer… Merci à **Rosalie** Delille, **Cécile** Nicolas, **Sylvain** Chambe, **Will** Champin, **Solenne** Gelly, **François-Xavier** et **Caroline** Arnoux, **Tanguy** et **Hélène** Jaillet, **Erik** Filhon, **Nicolas** Ernst, **Clément** Foray, **Juliette** Cuilleret. le groupe SGDF de Tassin & les pionniers caravelles, le groupe SGDF de Jacques Cassard & les marins, **Cécile** Bousigues, **Pauline** Feuillet, **Guillaume** Carrillo, **Ludivine** Bertonnier, **Clément** Dumas, **Emmanuelle** Bontemps, **Caroline** Basque, **Claire** Moal, **Anne-Estelle** Collette, **Lucile** Savagner, **Martin** de Gaillard, **Brune** Fichet, **Antoine** Escourrou, la famille Le Breton, **Cécile** et **Michel** Müller, **Marine** Tailfer, **Maxine** Dos Santos, **Romane** Cohade, **Pierre** Lerebours, **Hélène** Dury, **Céline** Alexandre, **Anne** et **Jean-Marie** Costamagna, **Gérard** Blayac, **Loïc** Belhomme, **Pauline** Allirol, **Camille** Causse, **Cédric** Mercadal, **Svetlana** Nicola, **Patrick** et **Christelle** Denis, **Marianne** Joubert, **Magali** Corniglion, **Elie** Chambon, **Maguelone** Lapeyre, **Lisa** Berton et bien d'autres encore !

Merci à ma **famille**, mes **parents** et mes **sœurs** pour leur soutien dans mes longues études. Un dernier merci tout particulier à **Géraud** pour son amour, sa patience et son sourire, à nous !

Table des matières

Table des matières

Dispersion, sélection et rôle des espèces microbiennes des levains en boulangerie française à faible intrant i

Dispersion, selection and effect of sourdough microbial species in low-input French bakery ... i

Remerciements iii

Table des matières vii

Liste des figures xiv

Liste des annexes xvi

Listes des tableaux xvii

Introduction générale 1

Chapitre I. Revue bibliographique 7

I. L'histoire évolutive des fermentations : du Mésolithique à nos jours 9

1. Les aliments fermentés, origine et domestication 9

2. La prise de conscience du monde vivant microscopique avec les travaux de Louis Pasteur 10

3. Fonctions des écosystèmes fermentaires 10

4. Les produits fermentés animaux et végétaux à travers le monde 13

II. Du blé au pain 14

1. Vue d'ensemble de la boulangerie 14

1.1. Une brève histoire du pain 14

1.2. Le pain en France 17

1.2.1. Histoire et univers symbolique du pain français 17

1.2.2. Etude française sur les représentations sociales et le rapport au pain 18

1.2.3 Réglementation française du pain de tradition française 19

1.2.4. Les différentes pratiques boulangères 20

1.3. Le renouveau du pain au levain 20

2. Le blé, son histoire 21

2.1. Généralités sur le blé 21

2.2. Le grain de blé 23

2.3. Les méthodes de culture du blé 25

2.4. Les micro-organismes liés à la graine 25

3. Les farines 27

3.1. Les méthodes de fabrication de la farine 27

3.2. Les protéines de la farine 28
3.3. La fraction glucidique de la farine 30
3.4 Les minéraux de la farine 30
3.5. Les micro-organismes de la farine 30
4. Les levains de panifications 32
4.1. Définition du terme levain 32
4.2. Les différents types de levain 32
4.3. La flore microbienne et son action fermentaire 33
4.3.1. Les bactéries lactiques 35
4.3.2. Les levures 39
4.3.3. Les interactions entre les levures et bactéries 41
4.3.4. Les paramètres abiotiques influençant la mise en place du microbiote 43
4.3.5. Origines possibles du microbiote des levains 44
4.3.5.1. Le terroir : microbiote du sol 44
4.3.5.2. La graine : enveloppe externe ou interne 44
4.3.5.3. La boulangerie : ustensile, eau, ingrédients supplémentaires 45
4.3.5.4. Les vecteurs biotiques de dispersion de microorganismes : le boulanger, les insectes, les oiseaux 45
4.3.6. Maintien du microbiote du levain 46
4.3.6.1. Dynamique au cours du temps 46
4.3.6.2. Structuration spatiale des communautés microbiennes des levains 46
5. Le pain au levain 47
5.1. Les qualités organoleptiques des pains 47
5.2. La recette du pain et le diagramme de panification 48
5.3. Les qualités nutritionnelles et digestes du pain au levain 48
III. Méthodes d'études en écologie microbienne des écosystèmes céréaliers 49
1. Les méthodes culture-dépendantes 49
1.1. Les milieux de culture 49
2. L'avènement des omics 51
2.2. L'étude des génomes microbiens 52
2.3. La métagénomique 53
2.4. L'étude du monde des ARN : la transcriptomique et la métatranscriptomique 53
2.5. La métaprotéomique 54
2.6. La description des flux métaboliques : La métabolomique 54

2.7. Intérêts et limites des *omics* 55
Chapitre II. Présentation générale des Matériels et Méthodes mis en en œuvre pendant la thèse 57
1. Echange de savoirs autour des pratiques boulangères et de levains entre boulangers et scientifiques 59
2. Processus de panification type 60
3. Echantillons biologiques 61
3.1. Collecte des levains de 38 boulangers, paysans-boulangers français 61
3.2. Construction d'une expérimentation collective et collecte des échantillons le long de la filière boulangerie à faible intrant 61
4. Caractérisation microbiologique des graines, farines et levains 63
4.1. Extractions d'ADN de graines, farines, levains 63
4.2. Extraction d'ADN de communautés microbiennes synthétiques (mocks) 63
4.3. Amplification d'un marqueur par PCR et séquençage 64
4.4. Construction d'une base de données de séquence de barcode pour les levures 64
4.5. Les analyses bio-informatiques 65
4.6. Analyse de méthodes culturales uniquement pour les levains 71
4.6.1. Dénombrement et isolement des bactéries et levures 71
4.6.2. Extraction d'ADN de chaque espèce 72
5. Caractérisation des farines 72
5.1. Granulométrie, analyse de l'activité enzymatique 72
5.2. Analyse des protéines par chromatographie en Size-exclusion HPLC (SE-HPLC) 72
5.3. Le taux de cendres 73
5.4. Analyse des capacités d'absorption d'eau des farines par le Mixolab 73
6. Caractérisation des pâtes 74
6.1. Observations de la pâte à pain 74
6.2. Suivi de la fermentation 74
7. Caractérisation des pains 75
7.1. Observations des pains 75
7.2. Analyses physico-chimiques des pains 75
7.3. Analyses sensorielles des pains 75
Chapitre III. Analyse de la diversité spécifique de levains biologiques français : une approche descriptive 89
Présentation des parties I et II 90

Partie I : Diversité des bactéries lactiques dans les levains issus de fermentation naturelle en boulangerie française à faible intrant 91
Abstract 93
Introduction 94
Materials and Methods 95
1.1. Sourdough and bread sampling 95
1.2. Microbial analysis 96
1.3. Determination of TTA (Total Titratable Acidity), pH, bread mass density and organic acids 98
1.4. Statistical analysis 99
1.5. Sourdough DNA extraction 99
1.6. Quantitative PCR to detect *L. sanfranciscensis* 100
1.7. Sequencing on MiSeq Illumina 100
1.8. Sequence analyses 101
Results and discussion 101
1. Enumeration of total LAB and yeast microflora 101
2. Physical and chemical characteristics 101
3. Estimated number of *L. sanfranciscensis* in sourdough by quantitative PCR 102
4. Sourdough isolate identification 104
5. Relative abundance of LAB species estimated by Illumina MiSeq Sequencing 106
6. Comparison of LAB diversity analyzed by the different approaches 106
7. Relationships between bread and sourdough physico-chemical and microbiological characteristics by Hierarchical Ascendant Classification 109
Conclusion 110
Partie II 115
Diversité des levures dans les levains issus de fermentation naturelle en boulangerie française à faible intrant 115
Abstract 117
Significance statement 117
Introduction 118
Results and discussion 119
1. Diversity of bread making practices 119
2. Culture and non-culture based analysis of fungi diversity 120
3. Distribution of fungi species diversity 124

4. The baker yeast, *Saccharomyces cerevisiae* is not the most common yeast species .. 125
5. The *Kazachstania* genus is highly represented in sourdough 125
6. The bread-making practices drive part of the yeast species distribution 126
Conclusion et perspectives 130
Materials and methods 130
a. A questionnaire survey, face to face interviews and focus-groups to collect bread-making practices 130
b. Species identification 131
c. Sourdough DNA extraction, MiSeq sequencing, bioinformatics and statistics analyses 131
d. Physico-chemicals analyses 132
Chapitre IV. Analyse de l'effet du terroir, des variétés de blé et des pratiques boulangères sur la diversité microbienne : une approche expérimentale participative 141
From wheat seeds to sourdough bread: microbial dispersion, selection and functional effect 144
Highlights 145
Keywords 145
Summary 145
Introduction 146
1. Participatory experimental design 148
1.1. Seeds samples 148
1.2. Milling and flours sampling 150
1.3. Sourdough samples 150
1.4. Doughs and breads 151
2. Microbial analysis 151
2.1. Culture-based method on sourdoughs, enumeration and isolates identification 151
2.2. Preparation and DNA extraction of seeds, flours and sourdoughs microflora 152
2.3. MiSeq sequencing 152
2.4. Sequences analyses 153
3. Physico-chemical analysis of sourdoughs, doughs 153
4. Bread analysis 153
5. Data statistical treatments 155
Results 156
1. Microbial community diversity along the bread food chain 156

2. A “core” microbial community found in seeds, flour and sourdoughs samples 159
3. Microbial community changes from seed to three week’s old sourdoughs 163
4. Drivers of microbial community diversity 167
5. Dynamic of microbial community composition in sourdoughs over backsloppings .. 170
6. Baker, wheat varieties and terroir effect on fermentation related bread properties 174
7. Bread minerals content was mostly influenced by wheat varieties and terroir 178
8. Bread aromas profils were mostly impacted by the baker’s origin of sourdough and the wheat terroirs 179
9. Bread sensorial perception and its link to other bread properties 180
Discussion 184
1. Microbial community flux and selection along the bread-making food chain 185
2. A specific dispersion and selection dynamic for *L. sanfranciscensis* 186
3. Backslopping practices: a good model to study the dynamic and adaptation of microbial community during ongoing domestication 187
4. What makes a sourdough stable: some perspectives 187
5. The bread organoleptic and nutritional profile, from the farm to the fork 189
Conclusion 190
Acknowledgments 190
Chapitre V. Diffusion des connaissances à destination d’un public large 191
A. La recherche participative, des échanges de savoir 193
B. Le projet BAKERY 195
C. Ma thèse pour tous 197
I. Un peu de bibliographie 198
1.1. Brève histoire du pain dans le monde et en France 198
1.2. Le pain en France 199
1.3. Les différentes pratiques boulangères 200
2. Quelques notions sur les blé et les farines 200
3. Les levains de panification 201
3.1. Définition du levain et classification 201
3.2. Les levains de panification sont composés de bactéries lactiques et de levures 202
3.3. Les interactions entre les levures et bactéries 203
3.4. D’où pourraient venir les bactéries et levures des levains ? 203
II. Description de la diversité des bactéries et des levures en France 204
1. Collecte et analyse des levains des boulangers de BAKERY 204

2. Les résultats en 3 points 206
2.1. La diversité des bactéries lactiques en France est grande ! 206
2.2. La diversité des levures dans les levains est grande et est structurée par la diversité des pratiques 206
2.3. Les caractéristiques physico-chimiques des levains et des pains 207
III. Etude de l'effet terroir, des variétés de blé, des pratiques boulangères sur la diversité microbienne dans les levains et sur les qualités nutritionnelles et organoleptiques du pain 208
1. Les participants 208
2. Le dispositif expérimental 209
3. Les analyses à ONIRIS, à l'INRA et à l'ITAB 210
4. Nos résultats en 15 points 213
D. Mieux se comprendre pour échanger les savoirs : exemple de la construction d'un glossaire 222
E. Une levure de paysan-boulanger porte le nom de la commune de Saulgé 245
Chapitre VI. Discussion générale 247
1. Origine de la diversité microbienne des levains 249
2. Dispersion et sélection des espèces microbiennes le long de la filière boulangerie 252
3. Impact fonctionnel et déterminant de la qualité des pains 255
4. Une conservation dynamique de la diversité des levains à travers la diversité des pratiques 256
5. La démarche participative 257
Perspectives de ce travail de thèse 258
Liste des communications 261
Communications scientifiques orales internationales 262
Communications scientifiques orales françaises 262
Communications vulgarisées orales et écrites 263
Publications 264
Références 265

Liste des figures

Figure 1. Schéma de la thèse « Dispersion, sélection et rôle des espèces microbiennes des levains en boulangerie française à faible intrant » 6
Figure 2. Histoire des fermentations et de la domestication des communautés microbiennes : d'une domestication sans connaissances des processus biochimiques de la fermentation à une domestication contrôlée par l'Homme 11
Figure 3 Métabolisme des levures en présence d'oxygène (Pišku r et al., 2006) 12
Figure 4. Voies principales bactéries lactiques (Gänzle, 2015) 13
Figure 5. Fabrication du pain au levain, schéma simplifié..... 14
Figure 6. Statuette d'une servante faisant de la pâte (Leek 1972) 15
Figure 7. Dessin d'une boulangerie du XVIIIè siècle, Source Marc Dewalque 16
Figure 8. Histoire des mots pain et boulanger..... 17
Figure 9. Analyse d'un corpus issus d'interviews de consommateurs du projet BAKERY 19
Figure 10. Epis de *Triticum* et *Hordeum* illustrant la diversité phénotypique 22
Figure 11. Généalogie des blés 23
Figure 12. Schéma d'un grain de blé en coupe d'après Surget et Barron 24
Figure 13. Localisation de quelques micro-organismes associés à la graine (Shade et al., 2017) 26
Figure 14. Composition des protéines du blé selon la classification d'Osborne (1907) et Shewry (1986) (Joubert, 2017; Shewry et al., 1986) 29
Figure 15. Analyse Scopus du mot « sourdough »..... 32
Figure 16. Coupe d'un levain en microscopie électronique d'après Onno et al., 2009 35
Figure 17. Arbre phylogénétique du genre *Lactobacillus* (O'Flaherty et al., 2018)..... 36
Figure 18. Schématisation globale et simplifiée des voies métaboliques et des fonctionnalités associées chez les bactéries lactiques des levains de panification (Lhomme et al., 2016a)..... 38
Figure 19. Vue d'ensemble de production des composés aromatiques par la levure..... 40
Figure 20. Distributions des espèces de levure rencontrées dans les levains en fonction des pays (A) et des matrices céréalières (B) (Carbonetto et al., 2018)..... 41
Figure 21. Levain et pain au levain : origines majeures des composés volatils et les facteurs principaux les influençant (Pétel et al., 2017)..... 47
Figure 22. Diagramme de panification français. Photos projet BAKERY 49
Figure 23. Schéma résumant matériels et méthodes mis en en œuvre pendant la thèse 59
Figure 24. Localisation géographique des boulangers BAKERY..... 60
Figure 25. Construction d'une expérimentation collective 63
Figure 26. Pipelines d'analyses lors des études de métabarcoding..... 71
Figure 27. Profil d'une chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et d'exclusion par la taille (SE)..... 72
Figure 28. Système Ankom et analyse de la pâte au toucher..... 74
Figure 29. Juges classant les échantillons de pain dans une épreuve de Napping 76
Figure 30. Variables factor map of first and second principal components after Principal Component Analysis (PCA)..... 111
Figure 31. The bread-making process 121
Figure 32. Multiple Correspondence Analysis (MCA)..... 122
Figure 33. The yeast species diversity was analysed for 38 out of the 39 sourdoughs. 123
Figure 34. Yeast diversity across France. 127

Figure 35. PCoA Analysis. 128
Figure 36. Figure S1 : Rooted trees on four different OTU identified as : a) *Sporidiobolales species*, b) *Bullera globospora*, c) *Trichosporon asahii*, d) *Udeniomyces pyricola*. 133
Figure 37. Figure S2. Unifrac distances computed with rooted trees on four different species. 133
Figure 38. Figure S3 All step of the bread-making process asked to the bakers, from wheat seeds to baked bread 134
Figure 39. Rarefaction curves of ITS1 barcode colored by matrix, e.g. seeds, flours, J0, S1, S2 and S3 157
Figure 40. Figure S4. Rarefaction curves of V3 V4 16S rDNA barcode colored by matrix, e.g. seeds, flours, J0, S1, S2 and S3 158
Figure 41. Figure S2. Alpha diversity (Specific richness on the left; Shannon index on the right) for *ITS1* barcode, calculated at species level 160
Figure 42. Figure S3. Alpha diversity (Specific richness on the left; Shannon index on the right) for V3-V4 16S rDNA barcode, calculated at species level. 160
Figure 43. Figure 1. Distribution of Fungi and Bacteria genus abundance across Seeds, Flours, Sourdoughs Communities 162
Figure 44. Figure 2. Fungal dispersion of (A) *Ascomycota*, (B) *Basidiomycota*, (C) *Saccharomycetales,* (D) *Firmicutes*, (E) *Proteobacteria*, (F) *Lactobacillus* from the wheat seeds, flours, sourdough at day 1 (J0), week 1 (S1), week 2 (S2) and week 3 (S3). 165
Figure 45. Figure 3. Network, constructed with weighted Unifrac distances calculated on fungi OTUs (A) and bacterial OTU (B). 166
Figure 46. Figure 4. PCoA on weighted-Unifrac distance on ITS and V3-V4 16S rDNA barcode 168
Figure 47. Figure 5A. Dynamic of yeast sourdough main species based on relative abundance, e.g. *Kazachstania bulderi*, *Kazachstania servazzii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus* in sourdough J0, S1, S2, S3 for each baker (MP, PV, HS, LM) and lab sourdoughs (LL). 172
Figure 48. Figure 5B. Dynamic of lactic acid bacteria sourdough main species, e.g. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *L. brevis*, *L. paralimentarius*, *L. curvatus* and *Pediococcus pentosaceus* in sourdough J0, S1, S2, S3 for each baker (MP, PV, HS, LM) and lab sourdoughs (LL). 173
Figure 49. Principal Component Analysis on 14 fermentation variables 174
Figure 50. Figure 7. Principal Component analysis on minerals variables (Fe, Zn, Ca, Mg, Cu, K, Na, P). 179
Figure 51. Figure 8. Principal Component Analysis on 39 volatils compounds. 180
Figure 52. Figure 9. Multiple factor analysis with breads made with wheat varieties grown on Terroir 3 (T3) and Terroir 4 (T4). 181
Figure 53. Map for each bread 183
Figure 54. Photo de groupe – Janvier 2018 196
Figure 55. Analyse sensorielle, épreuve de Napping – Novembre 2016 196
Figure 56. Analyses physico-chimiques au fournil – Novembre 2017 196
Figure 57. Coupe d'un levain en microscopie électronique d'après Onno et al., 2009 201
Figure 58. La carte de France : chaque point représente un boulanger de l'étude. 205
Figure 59. Protocole d'identification des espèces de bactéries et de levures à partir de boite de Petri 205

Figure 60. Espèces retrouvées dans les levains français. A gauche les bactéries, et à droite les levures 206
Figure 61. Acidité des levains de BAKERY 207
Figure 62. Acidité des pains de BAKERY 207
Figure 63. Carte des participants expérience effet terroir, variétés, boulangers 208
Figure 64. Retour en quelques images de nos 4 boulangers ayant initié et maintenu au cours du mois d'avril 2016, de leur fournil et des levains. 210
Figure 65. Schéma de la caractérisation de la flore microbienne 211
Figure 66. Représentation schématique de l'analyse des pains 212
Figure 67. Photos des pains en fin d'apprêt, juste avant enfournement 214
Figure 68. Représentation de la dispersion des bactéries et des levures du grain à un levain mature 216
Figure 69. Graphiques représentant la consommation du glucose, maltose et la production de glycérol, éthanol en fonction des boulangers, des variétés et des farines 217
Figure 70. Photos des pains BAKERY 218
Figure 71. Photos des tranches de pain 219
Figure 72. Flux microbiens le long de la filière boulangerie afin d'élucider l'origine des microorganismes du levain 221
Figure 73. Mesure de l'extensibilité par étirement de la pâte (extension uniaxiale) et appréciation de l'extensibilité par la formation d'un film (extension biaxiale) 231
Figure 74. Représentation de la dispersion des espèces microbiennes le long de la chaîne boulangerie, afin de comprendre les hypothèses quant à l'origine de la flore des levains 254

Liste des annexes

Annexes 1. Liste des boulangers du projet 77
Annexes 2. Petit guide de collecte des échantillons et des informations pour analyse dans le cadre du projet BAKERY 78
Annexes 3. Accord de transfert de matériel et relatif à l'étude sur la diversité des pratiques boulangères 80
Annexes 4. Fiche synthétique sur les risques de biopiraterie dans le contexte d'analyses génétiques de levains naturels 86

Listes des tableaux

Table 1. Distribution histologique des principaux constituants du grain de blé (%) D'après Feillet, 2000 et Joubert 25
Table 2. Les 6 types homologués de farines pour le blé par rapport au taux de cendres 28
Table 3. Les différents types de levain adapté de (Onno et al., 2009), (Lhomme et al., 2016a; Siepmann et al., 2017) 34
Table 4. Récapitulatif des grandes méthodes *omics*, définition, matrices utilisées, avantages, contraintes et situation dans l'étude des levains 56
Table 5. Caractéristiques des variétés de blés cultivés par les agriculteurs 62
Table 6. Diagramme de panification 62
Table 7. Espèces trouvées dans les levains et utilisées dans les communautés synthétiques (mocks) du pain. 66
Table 8. Espèces trouvées dans les levains et utilisées dans les communautés synthétiques (mocks) du vin. 68
Table 9. Espèces trouvées dans les levains et utilisées dans les communautés synthétiques (mocks) de la drosophile. 69
Table 10. Liste des amorces utilisées 70
Table 11. Les 6 types homologuées de farines pour le blé et leur taux de cendres associés ... 73
Table 12. Locations and practices of 16 French bakers 95
Table 13: Oligonucleotides primers used for PCR amplification and sequencing 97
Table 14: Total LAB and yeast enumeration (log CFU/g); physico-chemical characteristics of sourdoughs and related breads (mean values ± standard deviation). ND: Not determined ... 103
Table 15: Microbial diversity of 16 French organic sourdoughs. 108
Table 16: Cluster class centroids obtained by Hierarchical Ascendant Classification based on bread and sourdough physico-chemical and microbiological criteria 112
Table 17: Supplementary 1. Metabolism of strain *Lactobacillus heilongjiangensis* 113
Table 18: Supplementary 2. Metabolism of strain *Lactobacillus koreensis* 114
Table 19. Multivariate manova analysis on the unifrac distances 129
Table 20. Table S1. Code of each baker, location (French department, Region), practices (Baker / Farmer-baker), organic process (yes/no), collection date of sourdoughs and references 135
Table 21. Table S2. Alpha diversity indexes, number of species observed, Chao1,SE-Chao1 Shannon indexes 136
Table 22. Table S3. Univariate permutational Manova analysis performed on the Unifrac distance between the sourdoughs of 30 bakers which had less than 8 missing values among the 29 practices variables. 137
Table 23. Table S4. Oligonucleotides primers used for PCR amplification and sequencing 138
Table 24. Table S5. Abundance table (number of reads) per sourdough 139
Table 25. Table S5. Abundance table (number of reads) per sourdough (continued) 140
Table 26. Table S1. Characteristics of the wheat varieties cultivated by four French bakers 149
Table 27. Table S2. Wheat seeds sampling 149
Table 28. Table S3. Flours sampling 150
Table 29. Table 1. Specific richness of bacteria genus, bacteria species, fungi genus and fungi species. 161

Table 30. Table Results of multivariate PERMANOVA for fungi and bacterial abundance data. Permutations were based on a Weighted Unifrac distance matrix 169
Table 31. Table S6. Number of back-sloppings made by bakers each week of the experiment 171
Table 32. Table 4. Results of linear model for Terroir 3 and 4 to test Terroir, Varieties and baker effects. F and pvalue indicated for each variables, e.g. acidity, breads dimensions, minerals, bread organic acids and carbohydrates 175
Table 33. Table S7. Microbial density of sourdough, organics acids and sugars of bread 176
Table 34. Table S8. Minerals, acidity and dimension of breads 177
Table 35. Table 2. List of volatiles compounds in wheat sourdough bread. The compounds are classified by family, CAS number is indicated, their supposed origin and their flavor type. 182
Table 36. Comparaison de la recherche participative et conventionnelle, adapté de Cornwall and Jewkes, 1995 193
Table 37. Exemple d'un tableau de la feuille de suivi des levains 209
Table 38. Effets significatifs des facteurs qualitatifs (en colonnes) sur les variables quantitatives (en lignes). 220
Table 39. Liste des principales espèces de levures identifiées dans les levains des paysans et artisans boulangers + quelques éléments de caractérisation 229
Table 40. Liste des principales espèces de bactéries identifiées dans les levains des paysans et artisans boulangers de Bakery + quelques éléments de caractérisation 230
Table 41. Tableau de composition d’une farine type 55 231

Introduction générale

Introduction générale

L'origine, la dispersion et la diversité des microorganismes le long de la filière boulangerie sont le cœur de notre sujet de recherche. En effet, bien que le pain soit un aliment d'importance historique, culturelle et nutritive en France, la diversité microbienne utilisée par la filière boulangerie française est mal connue. Les procédés de fabrication du pain ont été bien décrits chez les boulangers français mais l'ensemble des pratiques boulangères artisanales n'a jamais été répertoriée ni mise en lien avec la diversité biologique (blés, diversité des micro-organismes des levains) de la filière. Les paysans-boulangers et de nombreux boulangers utilisent le levain : une pâte à base de farine et d'eau, avec une fermentation naturelle de 24h (décret n°93-1074 sur le pain au levain). Souvent, ces boulangers cherchent de façon plus globale à réduire leur empreinte écologique et à typer leur produits. Ils sont demandeurs d'informations sur le rôle de leurs pratiques, sur la diversité microbienne de leur levain, son action sur les caractéristiques des pâtes et, *in fine*, de leur pain.

De nombreuses espèces de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* et des espèces de levures du genre *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Pichia*, *Torulaspora* ont été décrites dans les levains. Ce microbiote joue un rôle dans la pousse, l'alvéolation et la flaveur du pain (levures) et sur l'acidité, le pH, la rhéologie et la conservation du pain (bactéries lactiques). Une étude récente, sur un petit échantillon, suggère que les paysans-boulangers maintiennent une diversité microbienne différente des artisans boulangers en France (Lhomme, 2015; Urien, 2015). Ces résultats sont-ils liés à un biais d'échantillonnage ? Comment sont alors structurées les communautés présentes dans les levains et de quels environnements provient cette microflore ? Quel rôle l'homme joue-t-il sur la dispersion et la sélection de ce microbiote ? Cette diversité a-t-elle un impact sur les caractéristiques du produit fini ?

Ma thèse cherche à répondre à ces questions. Elle est incluse dans le projet BAKERY (ANR ANR-13-ALID-0005), projet de recherche fondé sur la participation et collaboration d'équipes INRA, d'Oniris et d'Universités, de l'Institut Technique d'Agriculture Biologique, du Réseau Semences Paysannes et de plus de 40 boulangers/paysans-boulangers. Elle porte sur la diversité et les interactions d'un écosystème agro-alimentaire 'Blé/Homme/Levain' à faible intrant afin de mieux comprendre et soutenir la durabilité de la filière boulangerie. Cette thèse se veut répondre à plusieurs objectifs du projet Bakery :

- Décrire la diversité socio-culturelle des pratiques de boulangerie et la diversité microbiologique des levains chez les boulangers et paysan-boulangers en France
- Étudier les effets des variétés de blé, du terroir et des pratiques boulangères sur la diversité du microbiome levain, la qualité sensorielle et nutritionnelle du pain ainsi que les préférences des consommateurs

Plus précisément, les questions scientifiques posées dans le cadre de cette thèse sont les suivantes : Quels facteurs (géographie, pratiques boulangères, variétés de blé, terroir, fournil) structurent la diversité des communautés microbiennes des levains ? De quel(s) environnements(s) vient la microflore maintenue dans les levains (graines, farine, eau, fournil) ? Quel est l'impact des communautés microbiennes, du terroir, des variétés de blé, des boulangers sur la qualité nutritionnelle et organoleptiques des pains ?

Ce manuscrit s'articule en 6 chapitres (Figure 1) :

I. Le premier chapitre propose une revue bibliographique retraçant l'histoire évolutive des fermentations depuis la préhistoire à l'industrialisation des aliments fermentés. Cette revue détaille la filière boulangerie, de la graine jusqu'au pain, la flore microbienne des grains, des farines et des levains. Les principes des méthodes d'études de l'écologie microbienne boulangère, culture-dépendantes et –indépendantes, sont également présentées.

II. Le deuxième chapitre précise les matériels et méthodes appliqués à l'analyse de la flore microbienne, de la farine, et du pain

III. Le troisième chapitre, présenté sous forme d'articles concerne l'étude de la diversité des micro-organismes présents dans les levains français

    a. Dans une première partie, nous avons étudié la diversité des bactéries lactiques dans les levains français. Article, Michel et al., 2016.
    b. Dans une seconde partie, nous nous sommes attachés à l'étude de la diversité des levures des levains, associée aux pratiques boulangères. Article, Michel et al., 2018 (en préparation).

IV. Le quatrième chapitre présente la démarche expérimentale et les résultats de l'impact du terroir, des variétés de blés, des boulangers sur la diversité microbienne, les farines et le pain. Article, Michel et al. (en préparation).

V. Le cinquième chapitre constitue en un exercice de communication scientifique de cette thèse, démarche expérimentale et principaux résultats, à l'attention des partenaires boulangers non-scientifiques et aux néophytes, désireux de s'informer sur l'avancée des connaissances de la filière. Un glossaire est disponible dans cette partie, construit en collaboration avec des boulangers et des scientifiques du projet.

VI. Le sixième chapitre est consacré à la discussion générale. Il propose une discussion de l'ensemble des résultats obtenus et avancées établies en regard de la bibliographie et dresse les perspectives de ce travail.

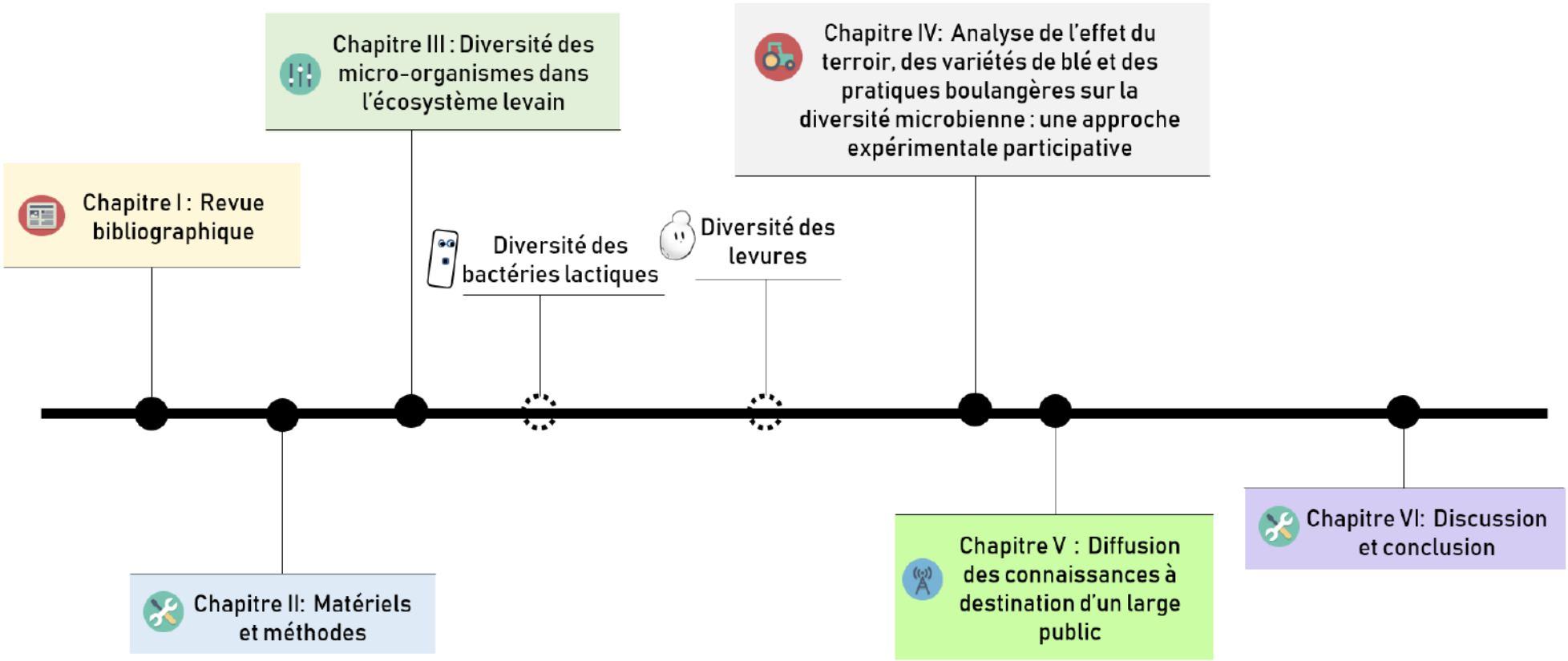


Figure 1. Schéma de la thèse « Dispersion, sélection et rôle des espèces microbiennes des levains en boulangerie française à faible intrant »

Chapitre I. Revue bibliographique

I. L'histoire évolutive des fermentations : du Mésolithique à nos jours

1. Les aliments fermentés, origine et domestication

L'origine de la fermentation remonterait à plus de 125 millions d'années, avant l'apparition des angiospermes et de l'Homme (Dashko et al., 2014; Hagman et al., 2014; Piškur et al., 2006; Thomson et al., 2005). Les primates auraient été confrontés aux fruits fermentés il y a 80 millions d'années, période correspondant à l'origine et à la diversification des préhominidés (Carrigan et al., 2015). Un variant allélique de l'alcool déshydrogénase de classe IV, responsable d'une meilleure oxydation de l'éthanol dans le tractus digestif, serait ensuite apparu. Il aurait été sélectionné il y a 10 millions d'années quand les primates seraient passés à un style de vie terrestre, en réponse à une plus forte sélection dans les fruits tombés au sol ayant un contenu en éthanol supérieur à celui des arbres (Carrigan et al., 2015). L'appétence des primates fructivores pour l'alcool se serait développée et aurait favorisé la dispersion des graines matures au Paléolithique. Ces résultats (Carrigan et al., 2015) restent toutefois discutés (Dominy, 2015). D'autres chercheurs avancent plutôt que l'adaptation des hominidés à l'alcool a vraiment démarré au Néolithique avec la domestication des plantes, des animaux et la nécessité de stocker des aliments (Levey, 2004).

Les premières traces d'aliments transformés par fermentation par l'homme pré-daterait la domestication des micro-organismes (Arranz-Otaegui et al., 2018; Salque et al., 2013). La production d'aliment fermentés se serait ensuite répandue avec la domestication des animaux et des végétaux, l'avènement de l'Agriculture (~ -7000 avant JC) et l'évolution des outils et des savoir-faire (McGovern et al., 2004). L'Homo sapiens du Paléolithique Supérieur a d'abord domestiqué les animaux et les plantes de façon sporadique, pour un nombre limité d'espèces et dans des circonstances particulières (Diamond, 2002; Vigne, 2011; Zeder, 2008). La Néolithisation de l'Europe a alors vu la transformation des chasseurs-cueilleurs en communautés agro-pastorales (Tresset and Vigne, 2011). A cette période, l'Homme a commencé à pratiquer des fermentations empiriques (levain, pied de cuve ou mousse de bière) afin de conserver mieux les aliments, de contrôler intuitivement la toxicité due à des développements de germes pathogènes et d'améliorer, diversifier les saveurs (Figure 2). Il a su, à l'aide de procédés simples, sélectionner, orienter les micro-organismes afin de préserver l'aliment (Lortal, 2015). Il a alors domestiqué les communautés microbiennes à son profit sans connaître leur existence.

2. La prise de conscience du monde vivant microscopique avec les travaux de Louis Pasteur

La découverte du monde microscopique grâce à Antoni van Leeuwenhoek au 17ème siècle et de la fermentation par Louis Pasteur firent évoluer radicalement l'approche de la technologie alimentaire et des aliments fermentés. La mise au point de la stabilisation par traitement thermique, technique dénommée ensuite pasteurisation, associée à la maîtrise de la culture microbienne furent des étapes clés dans le début de sécurisation des procédés fermentaires tant pour une meilleure maîtrise des procédés que pour les aspects sanitaires (Lortal, 2015). L'essor de l'urbanisation du 19ème et 20ème siècle a encouragé l'industrialisation des produits alimentaires et a conduit à une standardisation des procédés. L'ajout de ferments comme la levure de bière en panification au 19ème siècle deviendra alors incontournable pour fabriquer en quantité « industrielle ». De la génétique apparue au XIXème siècle avec Mendel et la découverte de l'hélice d'ADN en 1953, les ferments seront alors sélectionnés jusqu'au niveau de la souche pour une fermentation totalement contrôlée (Sabra et al., 2010). Les communautés microbiennes mobilisées dans la production d'aliments au cours de fermentations naturelles sont remplacées par ces ferments, composés d'un nombre restreint d'espèces, voire d'une seule souche d'une espèce comme par exemple pour la panification, une souche de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Steensels and Verstrepen, 2014).

3. Fonctions des écosystèmes fermentaires

Selon Pasteur, la fermentation est un processus de lente décomposition des substances organiques par des microorganismes ou par un complexe enzymatique d'origine animale ou végétale (Pasteur, 1857). C'est un processus permettant de produire selon les microorganismes incriminés des acides organiques, du CO_2, d'autres composés comme l'alcool. Le glucose est transformé en acide pyruvique par la glycolyse, qui est une suite de réactions enzymatiques. Afin de régénérer des cofacteurs (NAD+), ce pyruvate est utilisé par des micro-organismes, tels *Lactobacillus*, *Streptococcus* pour produire de l'acide lactique dans les produits laitiers et les produits végétaux. Il peut aussi être transformé en acétaldéhyde pour produire de l'éthanol par les levures, telles des *Saccharomyces*. Dans le pain à la levure, le boulanger provoque une fermentation alcoolique par la levure « de boulangerie » *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentation alcoolique convertit des glucides tels que le glucose, le fructose et le saccharose en éthanol CH_3CH_2OH et dioxyde de carbone CO_2 avec production d'une faible quantité d'énergie métabolique sous forme d'ATP. Lors de la formation de l'éthanol, le pyruvate …/…

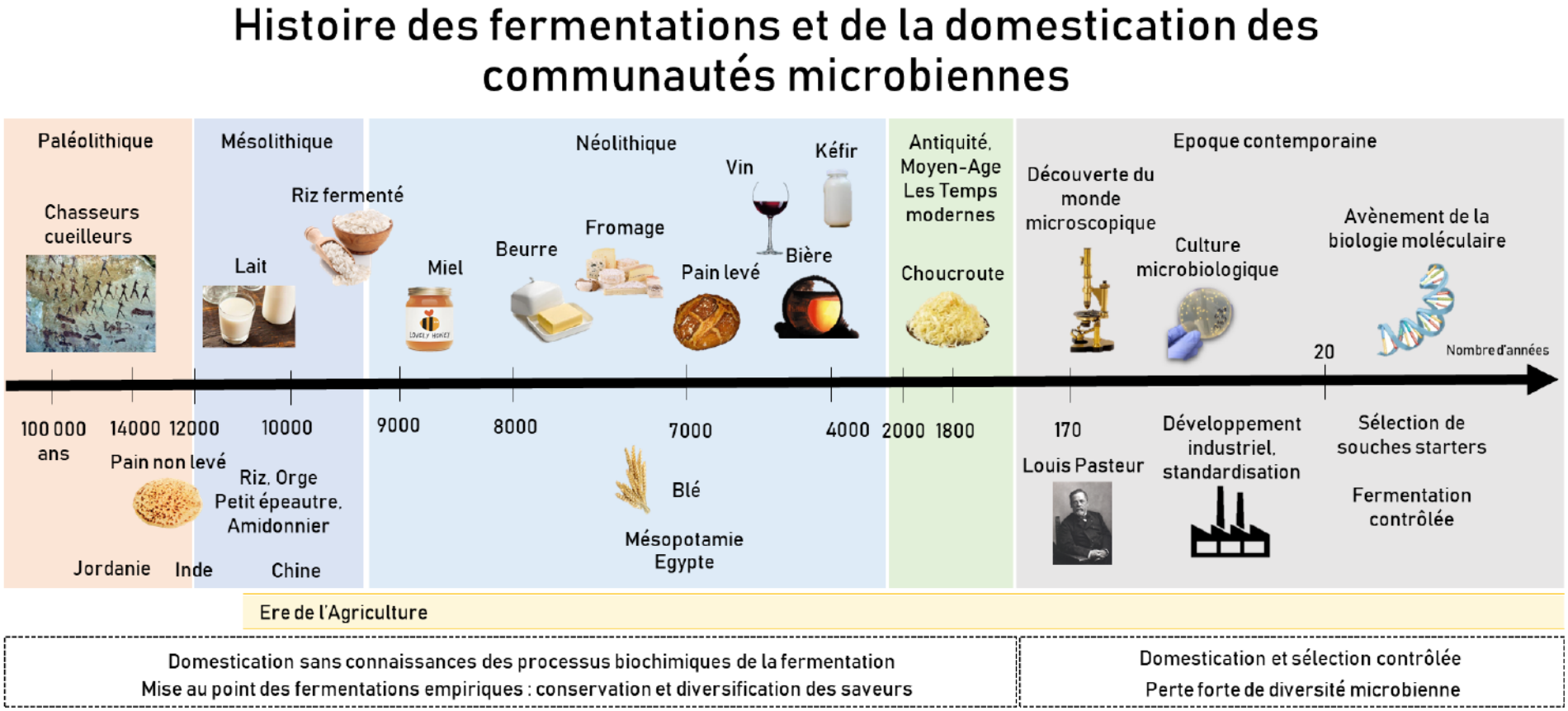


Figure 2. Histoire des fermentations et de la domestication des communautés microbiennes : d'une domestication sans connaissances des processus biochimiques de la fermentation à une domestication contrôlée par l'Homme

(Arranz-Otaegui et al., 2018; Battcock, 1998; Carretero et al., 2017; Curry, 2013; Darby et al., 1977; Doebley et al., 2006; Gerbault and Roffet-Salque, 2017; Hansson, 1994; Lortal, 2015; McGovern et al., 2004; Nair and Prajapati, 2003; Pearson and Gillett, 1996; Salque et al., 2013; Shevchenko et al., 2014; Valamoti et al., 2007)

CH_3COCOO- issu de la glycolyse est d'abord décarboxylé en acétaldéhyde CH_3CHO avec libération d'une molécule de dioxyde de carbone CO_2, puis réduit en éthanol CH_3CH_2OH par l'alcool déshydrogénase avec oxydation d'une molécule de NADH en NAD+. Les levures peuvent produire plusieurs métabolites en plus du CO_2 et de l'éthanol comme le glycérol, l'acétate et d'autres métabolites intermédiaires pouvant présenter des propriétés aromatiques (Figure 3).

La fermentation lactique est soit homofermentaire, hétérofermentaire facultative ou hétérofermentaire selon les espèces de bactéries lactiques. La voie homofermentaire convertit des glucides tels que le glucose, d'autres hexoses et des diholosides formés d'hexoses en lactate $CH_3CHOHCOO^-$. Le pyruvate CH_3COCOO^- est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase avec oxydation d'une molécule de NADH en NAD^+. Les bactéries lactiques hétérofermentaires quant à elles peuvent produire en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique, du CO2 et d'autres métabolites (Figure 4).

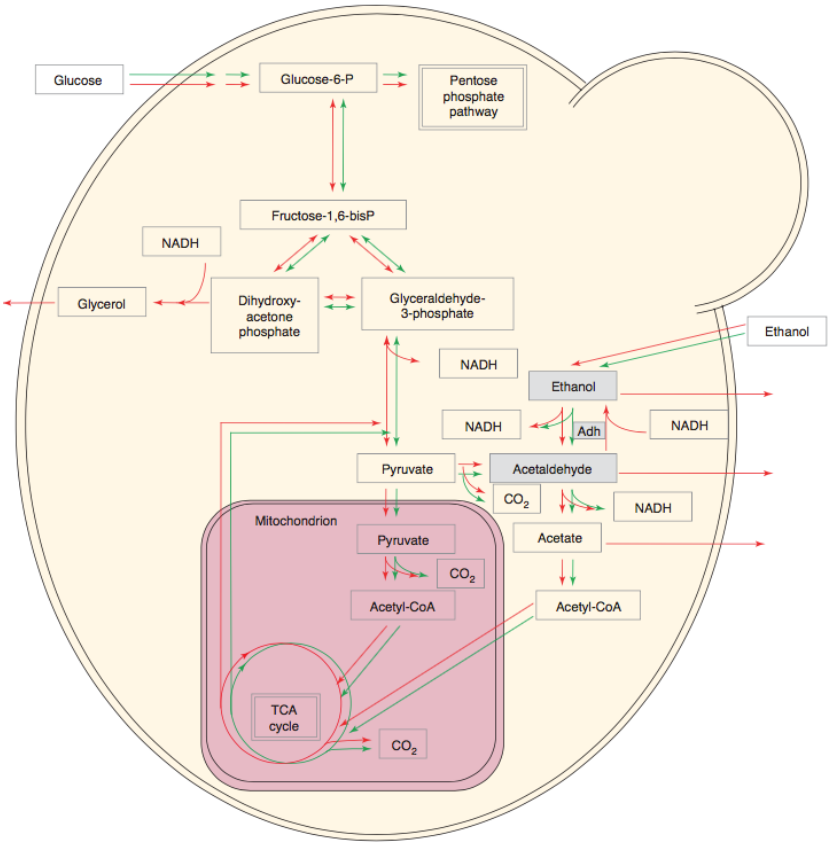


Figure 3 Métabolisme des levures en présence d'oxygène (Piškur et al., 2006)

Les levures « Crabtree négative » (flèche verte) sont incapables de fermenter en présence d'oxygène et les « Crabtree positive » (flèche rouge) sont capables de fermenter en présence d'oxygène et d'accumuler de l'éthanol qu'elles peuvent consommer après.

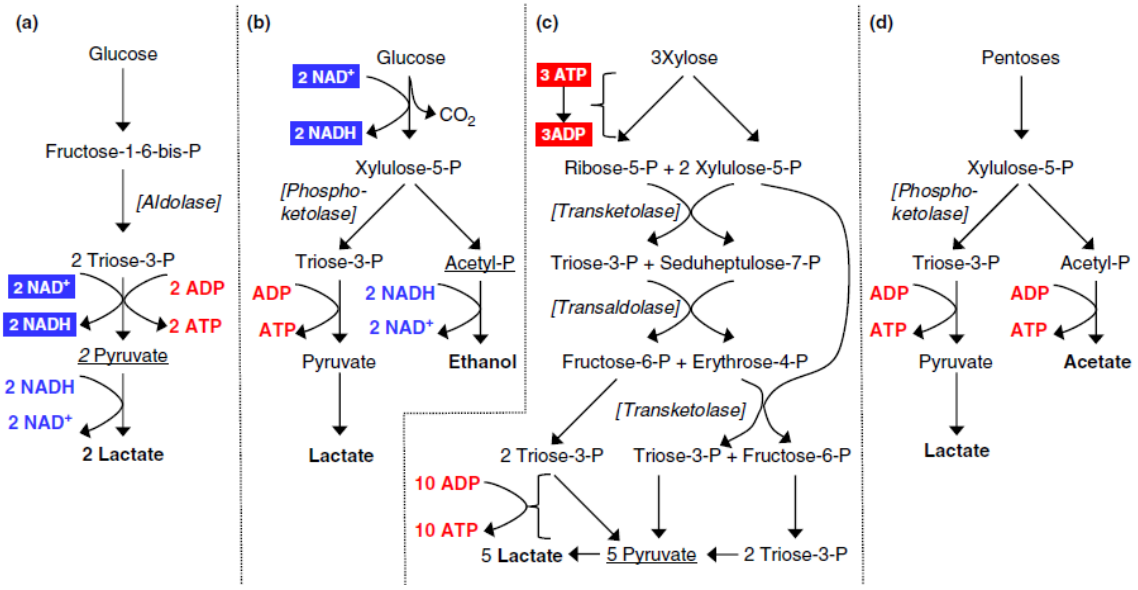


Figure 4. Voies principales bactéries lactiques (Gänzle, 2015)

Les fermentations alcoolique et lactique, respectivement par les levures et les bactéries lactiques sont des procédés très anciens et utilisés depuis l'Antiquité pour préserver les aliments. Les levures et bactéries lactiques sont très souvent utilisées dans de nombreuses fermentations alimentaires industrielles, soit par ajout de starters, soit par fermentation spontanée. Ces microorganismes contribuent ainsi à la prévention de la croissance des micro-organismes pathogènes ou de contamination et augmentent la durée de vie des produits fermentés tels que les produits laitiers (fromages, yaourts), la viande (saucisson), les végétaux (choucroute, olive), les boissons (vin, cidre) et les céréales (pain) (Hammes and Vogel, 1995; Pot and Tsakalidou, 2009; Ravyts et al., 2012).

4. Les produits fermentés animaux et végétaux à travers le monde

Plus de 5000 aliments fermentés sont répertoriés dans le monde, pain, fromage, viande, végétaux fermentés, vin, bière, etc (Tamang et al., 2016). Ils sont classés en neuf groupes majeurs. On recense les céréales fermentées, les légumes fermentés, le soja et autres légumineuses fermentés, les racines ou tubercules fermentés, les produits à base de lait fermenté, les viandes fermentées, les poissons secs, fumés et fermentés, et les divers autres produits fermentés et les boissons alcoolisées. Ils sont soit ensemencés avec un ferment commercial pour la plupart des aliments fermentés, soit ensemencés avec un échantillon d'une matrice précédemment fermentée (technique dite du « *backslopping* »). Chaque communauté

dans le monde a une culture alimentaire distincte, incluant les produits fermentés et les boissons alcoolisées, symbolisant l'héritage et les aspects socio-culturelles de l'ethnicité (Tamang et al., 2016). Dans une grande partie du monde, les pratiques artisanales demeurent, favorisant le maintien de la diversité microbienne. Même en France cohabitent des aliments fermentés industrialisés et standardisés qui s'exportent dans le monde entier et des produits artisanaux vendus en circuit moyen court (Lortal, 2015).

II. Du blé au pain

1. Vue d'ensemble de la boulangerie

> *La pâte à pain est composée de farine, d'eau, d'un agent de fermentation (levure et/ou levain) et de sel. La pâte est fermentée après le pétrissage pendant le « pointage » et après avoir été façonnée lors de « l'apprêt ». La pâte est alors prête pour être cuite au four.*

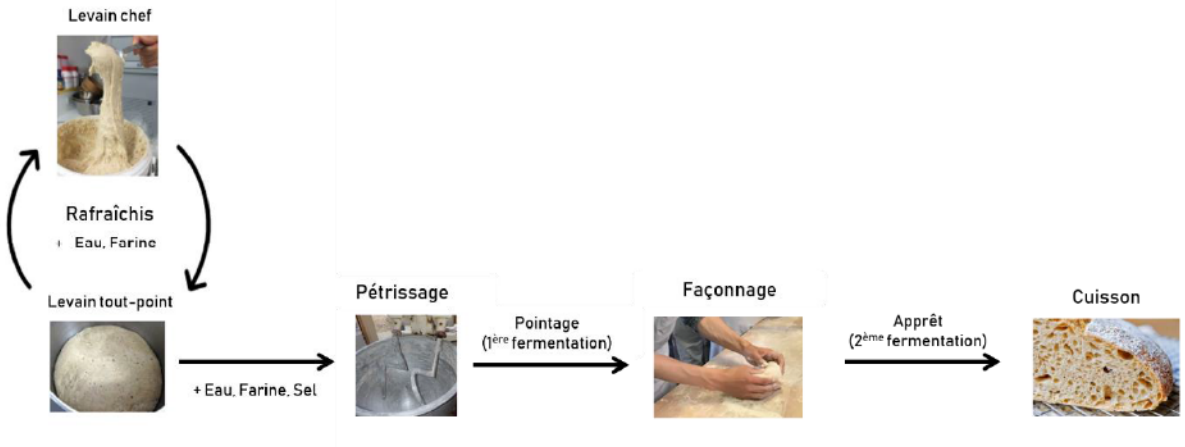


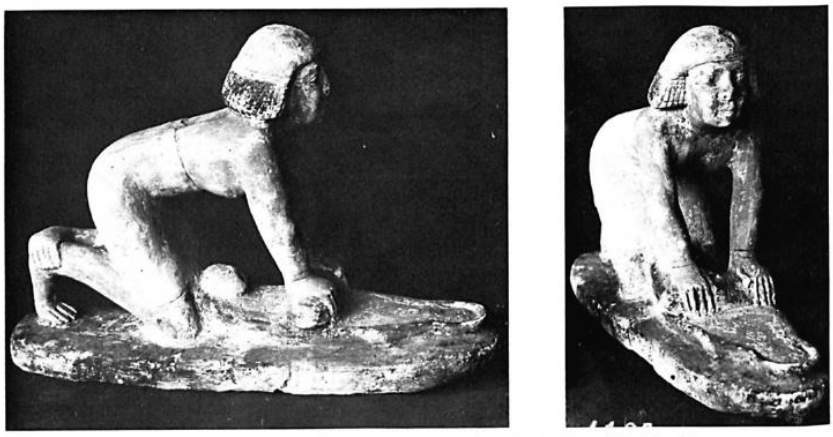
Figure 5. Fabrication du pain au levain, schéma simplifié

1.1. Une brève histoire du pain

Le pain a de multiples formes, est levé, non-levé, cuit dans le four familial ou dans le fournil du boulanger du village. Le symbole du pain est important dans les traditions religieuses depuis l'Antiquité. Il est omniprésent dans les religions chrétiennes, considéré comme noble et chargé d'un symbolisme eucharistique puissant (Kwon and Tamang, 2015). Un pain de blé non-levé est utilisé lors de la Pâque juive (Hébreu: "matzo") (Regenstein et al.). Au Soudan, traditionnellement au moment du Ramadan, une boisson fermentée de pain de sorgho traditionnelle est préparée en imbibant des tranches de pain levé dans de l'eau (Kwon and

Tamang, 2015). Il est non seulement important pour la nutrition mais dans notre vie économique, sociale et rituelle. Il a été et est toujours un aliment de base en Europe et au Moyen-Orient, et a traversé les siècles jusqu'à notre époque (De Tonnac, 2010). La fabrication du pain a suivi la domestication des céréales il y a plus de 14400 ans. Les chercheurs n'arrivent pas à déterminer si la domestication des céréales est liée à la satisfaction de la soif et la fabrication de la bière ou pour répondre à la faim via la fabrication du pain (Braidwood et al., 1953; Katz and Voigt, 1986).

Les archéologues retracent la fabrication du pain dès le Mésolithique (Arranz-Otaegui et al., 2018). Ils ont retrouvé des traces de pâtes, de pain et de porridge observés au microscope sur un site archéologique d'Anatolie centrale (Çatalhöyük East, actuelle Turquie) qui date de 6000-7100 ans avant JC (Carretero et al., 2017). Les Egyptiens (~3000 – 30 ans avant JC) étaient surnommés quant à eux « les mangeurs de pains », c'était leur nourriture par excellence (Leek, 1972). De nombreuses figurines (Figure 6) et des fresques peintes décrivent les pratiques agricoles et alimentaires des anciens égyptiens. C'était une pratique commune de placer du pain dans les tombes, espace sacré et protégé, pour leur vie dans l'au-delà, (Samuel, 2002). Du pain a été notamment retrouvé dans des tombes du peuple commun, des nobles et même dans la tombe des Pharaons. Lors de l'excavation de la tombe de Toutankhamon, du pain et une meule manuelle pour moudre le grain ont été trouvés (Carter and Mace, 2012; Leek, 1972). En Chine, il y a 2500 ans, les habitants de Subeixi étaient également capables de fermenter les grains de céréales et les pains au levain étaient leur quotidien (Shevchenko et al., 2014).



2. Old Kingdom limestone statuette of a woman servant making dough. Part of the Nanupkan group

Courtesy of the Oriental Institute, Chicago

TEETH AND BREAD

Figure 6. Statuette d'une servante faisant de la pâte (Leek 1972)

Les Grecs ont contribué à l'amélioration de la meunerie par l'invention de moulins à pierre sophistiqués, comme décrit à Olynthus (Frankel, 2003). A l'époque romaine, Juvénal utilisa dans la Satire X l'expression « *Panem et circenses* », soit « du pain et des jeux » pour considérer les préoccupations du peuple (Satires, Satire X). De plus, les magistrats romains assuraient des distributions régulières de blé pour calmer la population. Des fouilles archéologiques dans les Pyrénées ont permis la mise à jour de l'activité humaine du II^{ème} au XII^{ème} siècle. Ils décrivent l'activité agriculture et mentionnent que ce peuple écrasait son grain pour faire du pain (Alonso et al., 2010). D'après différents écrits historiques, le pain était l'objet de reconnaissance sociale au Moyen-Âge, et le pain portait le nom de la caste qui le consommait : « pain de cour », « pain de chevaliers », « pain d'écuyers », etc. Le grain à écraser et la pâte levée étaient amenés aux moulins et aux fours des seigneurs. A partir du XVIe siècle, une police du grain et du blé détermine le prix de vente du pain. A la fin du XVIIIe siècle (Figure 7), avec la suppression de la gabelle, l'impôt sur le sel, l'usage du sel dans le pain se répand.

La découverte des micro-organismes et l'industrialisation ont marqué un tournant dans le monde de la boulangerie. Le pétrin mécanique apparaît au début du XIX^{ème} siècle et la levure pressée à la fin de ce même siècle. La hausse du niveau de vie transforme le pain d'une nourriture de base à un aliment d'accompagnement. La technique de pétrissage « intensifiée » apparaît et permet la fabrication d'un pain très blanc, plutôt fade et se conservant peu de temps. Il change du pain noir rationné pendant les deux guerres mondiales. Cette baisse générale de la qualité du pain enclenche la diminution de sa consommation et le développement des boulangeries industrielles.

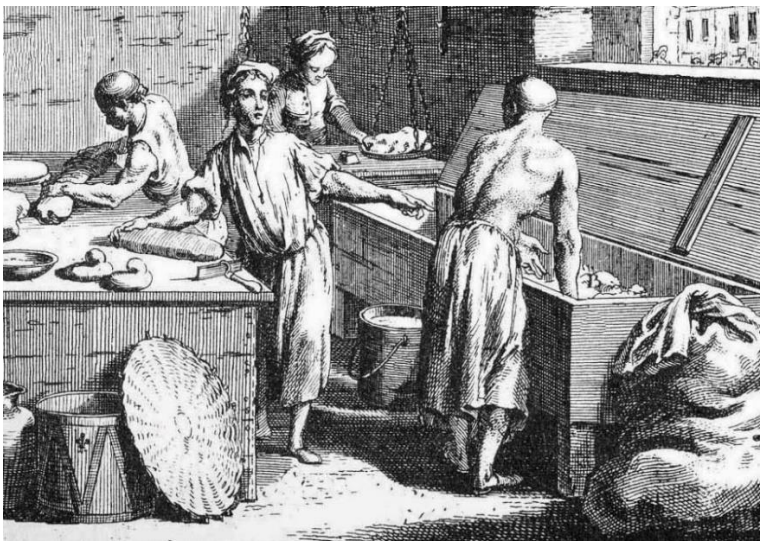


Figure 7. Dessin d'une boulangerie du XVIIIè siècle, Source Marc Dewalque

1.2. Le pain en France

1.2.1. Histoire et univers symbolique du pain français

Le mot *pan* est apparu à la fin du Xè siècle, depuis le latin *panis*, donnant pain dès 1120. Au XIIIe siècle, le gagne-pain qualifia d'abord un ouvrier recevant un petit salaire. C'est maintenant ce qui assure la subsistance de quelqu'un, soit un instrument, une activité qui lui sert à gagner sa vie. D'un autre côté, apparu sous les formes *bolengarius* (1100), *bolengerius*, traduit en *bolengier*, notre mot boulanger, -ère (1299) dérive de l'ancien picard *boulenc*, « faiseur de pains en boule » (Pierre Delaveau, Défense de la langue française nº 237). Le terme culinaire pour tous les plats accompagnés de pain à partir du XIIème est le companage (du latin *cum*, avec et *panis*, pain). Boulanger a éliminé l'ancien français *pesteur*, du latin *pistor*, « celui qui pétrit la pâte », mot dont on retrouve la trace dans pistou, nom provençal du basilic, que l'on écrase avant de l'introduire dans des plats, et dans le verbe *pister* du vocabulaire pharmaceutique ancien (Figure 8).

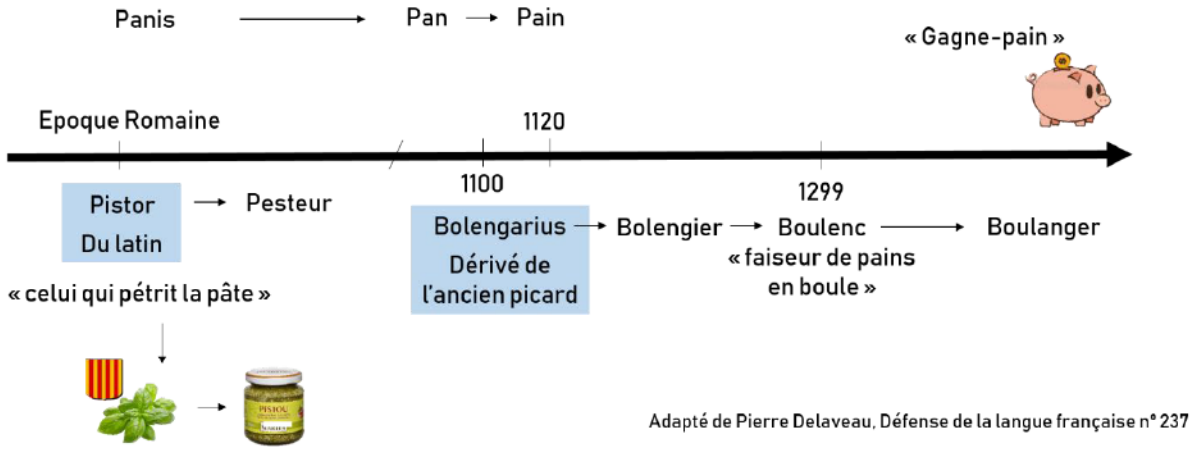


Figure 8. Histoire des mots pain et boulanger
Adapté de Pierre Delveau, Défense de la langue française n°237

Avec ses 39000 boulangeries, pâtisseries, chocolaterie, glacerie (Chiffre Confédération Nationale des Artisans Décembre 2017), dont 33000 boulangeries (Source Hubert Chiron), la place du pain est très importante en France. C'est un aliment doté d'une puissance symbolique, incarnant la notion de partage. Nous avons tous des souvenirs de rituels entourant la consommation du pain : « On ne le posait pas à l'envers sur la table, et avant d'entamer le pain, il fallait faire une croix avec le couteau derrière le pain », « c'est un aliment que l'on respecte », « c'est un aliment qui ne se jette pas » (extraits d'interviews de consommateurs par Estelle Masson et Sandrine Bubbendorf, réunion ANR BAKERY janv. 2017). L'importance du pain

en tant que symbole et valeur est également démontrée par les expressions « gagne-pain », « pour une bouchée de pain », « avoir du pain sur la planche », couramment utilisé dans notre vocabulaire (Roussel et al., 2002).

1.2.2. Etude française sur les représentations sociales et le rapport au pain

D'après Marie Astier, 80% des adultes français mangent du pain quotidiennement. La consommation par habitant s'établit à 130 grammes par jour (Astier, 2016). « Le pain est davantage porteur de sens que de connaissances », observe Abdu Gnaba (Gnaba, 2011). Dans le cadre du projet ANR BAKERY, Estelle Masson et Sandrine Bubbendorf, psycho-sociologues, ont travaillé sur les représentations sociales et le rapport au pain. Elles ont interrogé 26 consommateurs achetant leur pain dans différents lieux : AMAP (8), Fournil (7), Boulangerie (5), Marché (4), Biocoop (1), Supermarché (1) au cours d'entretiens approfondis et ont pu recueillir un matériel riche. Les résultats de cette étude sont encore non publiés mais sont présentés brièvement ci-dessous. Elles ont utilisé le logiciel d'analyse de données textuelles Alceste. Le logiciel Alceste, à partir de la retranscription des entretiens de consommateurs effectue une première analyse détaillée du vocabulaire, et constitue le dictionnaire des mots ainsi que de leur racine, avec leur fréquence. Cette méthode permet d'extraire des classes de sens, constituées par les mots et les phrases les plus significatifs, les classes obtenues représentent les idées et les thèmes dominants du corpus (Reinert, 1986).

Avec cette analyse d'Alceste, elles ont montré que le rapport au pain est classé en 5 classes lexicales, qui peuvent se regrouper en deux univers sémantiques distincts (Figure 9) : 1) l'univers du pain et 2) l'univers de l'offre alimentaire et critère de choix. L'univers du pain se divise en 3 classes lexicales : « manger du pain », « choisir son pain » et « la fabrication du pain ». L'univers de l'offre alimentaire et les critères de choix se divise en deux classes lexicales : « *buycott* et *boycott* » et « aspirations et engagements citoyens » (Figure 9). Ces entretiens montrent que le rapport au pain au levain est chargé d'affect, et relève de motivations diverses (bien-être/goût, savoir ce que l'on mange, se réapproprier son alimentation). Cela soulève des problématiques sociétales mais ne semblent pas centré sur la santé. Selon cette étude, le rapport au pain au levain est inscrit dans la modernité alimentaire, dans le processus de réappropriation de l'alimentation. Il est lié à un bénéfice santé et à une action citoyenne, avec une dimension éthique, environnementale, sociétale quand l'achat et la consommation de pain est pensé.

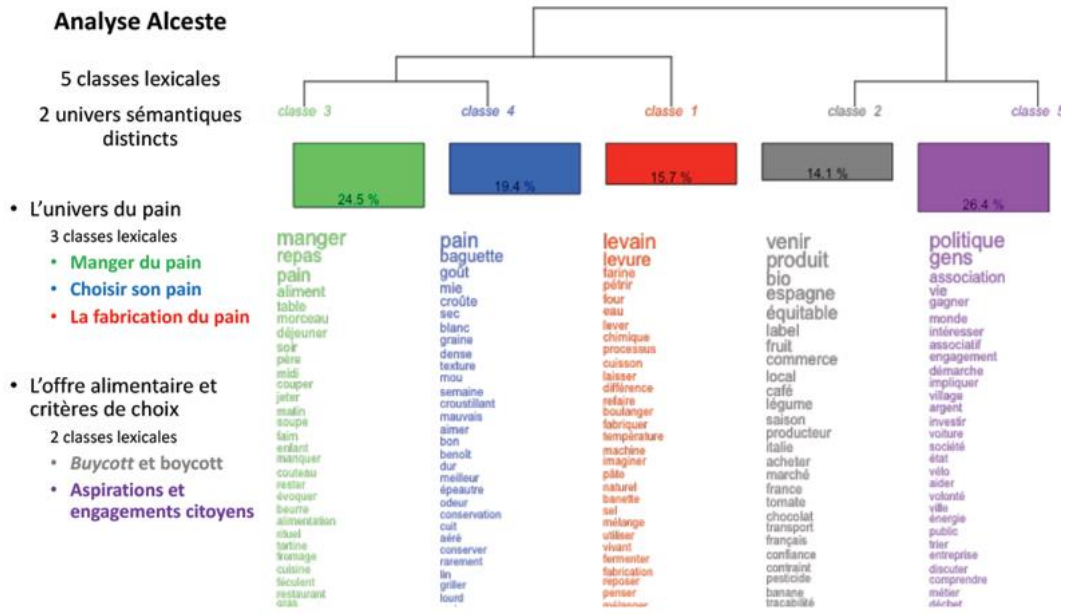


Figure 9. Analyse d'un corpus issus d'interviews de consommateurs du projet BAKERY Corpus analysé avec le logiciel Alceste

1.2.3 Réglementation française du pain de tradition française

Le pain de tradition française est réglementé par le décret N°93-1074 de 1993 (RF Journal Officiel) qui définit précisément ce que doit être un pain dénommé « pain de tradition française », ou "pain traditionnel français", ou "pain traditionnel de France". Selon l'article 2, ce pain doit être composé d'un mélange de farine de blé, d'eau potable et de sel de cuisine, être fermenté à la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et/ou au levain et éventuellement contenir de la farine de fèves, soja ou malt de blé en proportion faible (respectivement 2%, 0,5%, 0,3% de farine). Selon l'article 4 de ce décret, « le levain est une pâte composée de farine de blé et de seigle, ou de l'un seulement de ces deux ingrédients, d'eau potable, éventuellement additionnée de sel, et soumise à une fermentation naturelle acidifiante, dont la fonction est d'assurer la levée de la pâte. Le levain renferme une microflore acidifiante constituée essentiellement de bactéries lactiques et de levures. Toutefois, l'addition de levure de panification (*Saccharomyces cerevisiae*) est admise dans la pâte destinée à la dernière phase du pétrissage, à la dose maximale de 0,2% par rapport au poids de farine mise en œuvre à ce stade. »

L'article 3 de ce même décret dit que « peuvent seuls être mis en vente ou vendus sous une dénomination comportant la mention complémentaire "au levain" les pains (…) présentant

un potentiel hydrogène (pH) maximal de 4,3 et une teneur en acide acétique endogène de la mie d'au moins 900 parties par million ». Nos résultats et de précédentes recherches montrent que cette définition est trop restrictive et ne prend pas en compte la diversité des pratiques boulangères et des propriétés des pains au levain (Lhomme et al., 2015a; Michel et al., 2016; Roussel et al., 2002). Un travail est en cours pour une nouvelle définition du levain, du pain au levain au plus proche de la réalité.

1.2.4. Les différentes pratiques boulangères

La France est représentée par une multitude de pratiques boulangères. Parmi les boulangers, on distingue les artisans boulangers inscrits à la chambre des métiers, les paysans boulangers qui sont inscrits ou non à la chambre des métiers, les boulangeries industrielles. Ils sont amenés à réaliser du pain au levain naturel à fermentation lente et/ou à la levure. Ces boulangers se différencient principalement dans leur façon de procéder pendant la panification et dans la fréquence des panifications. Actuellement, le nombre de boulangeries artisanales décroît avec l'offre pléthorique des hypermarchés et nouvelles chaînes telles Marie Blachère, Ange, etc. Ces enseignes ont des méthodes de vente agressives proposant un accès simple au magasin et un coût du pain défiant toute concurrence (Astier, 2016).

Il est difficile d'avoir une estimation exacte du nombre de paysans-boulangers. Leur nombre est en forte croissance. Ces boulangers restent cependant très peu mécanisés et ont donc une production hebdomadaire ou mensuelle modeste. Ils vendent notamment du pain à la ferme, en AMAP (Aide pour le Maintien de l'Agriculture Paysanne), dans les circuits locaux courts. Ils proposent une alternative à la boulangerie industrielle en offrant du pain de tradition. Ils sont au premier plan pour réhabiliter les populations des blés anciens, afin de concourir au maintien de la diversité des blés et avoir des blés adaptés à leur terroir. Il s'agit donc d'une démarche qui replace le paysan dans son rôle de conservateur de semences, l'inscrit dans une économie de proximité et lui redonne son autonomie (Demeulenaere et al., 2017). Actuellement, il semble nécessaire de proposer une diversité de pratiques et de goût pour répondre aux besoins de la demande diversifiée des consommateurs.

1.3. Le renouveau du pain au levain

Depuis les années 1980, le pain au levain connaît un regain de popularité grâce aux consommateurs à la recherche de l'authenticité et du goût du pain (Calvel, 1981). Manger du

vrai pain est devenu un moyen de se réapproprier son alimentation, à maîtriser et à savoir ce que l'on mange (cf 1.2.2). Le renouveau du pain au levain passe par des artisans, les paysans boulangers, des artisans meuniers, des restaurateurs gastronomes, des particuliers boulangers amateurs, mais aussi par des industriels (producteurs de ferments, meuniers, boulangerie industrielles).

2. Le blé, son histoire

2.1. Généralités sur le blé

Le blé est un terme générique désignant plusieurs céréales, classé comme règne *Plantae*, de classe *Liliopsida*, d'ordre *Cyperales*, de famille *Poaceae* et appartenant au genre *Triticum*. Ce sont des plantes annuelles de la famille des graminées. Le substantif masculin « blé » est issu de l'ancien bas francique *blād, « produit de la terre » (Le Dictionnaire historique de la langue française, Dictionnaires le Robert). Deux types variétaux importants sont utilisés actuellement. Le blé dur *Triticum turgidum* subsp. *durum*, riche en gluten est utilisé pour produire les semoules et les pâtes alimentaires. Le blé tendre *Titricum aestivum* est utilisé pour faire de la farine panifiable, et près de 352 variétés de blé tendre, d'hiver et de printemps, sont inscrites au Catalogue officiel français des espèces et variétés en 2018 (source : https://www.geves.fr/catalogue/). A ces deux espèces s'ajoutent l'épeautre (*Triticum aestivum subsp. spelta*) ou grand-épeautre, sous-espèce du blé tendre, très utilisé en agriculture biologique en raison de sa rusticité et de sa qualité panifiable ; l'engrain ou petit-épeautre, (*Triticum monococcum*), espèce à grain vêtu à faible rendement, très anciennement cultivée ; les amidonniers ou épeautre de Tartarie (*Triticum turgidum subsp*. *dicoccum*) : blés vêtus à faible rendement, mais adaptés aux sols pauvres et arides. Une illustration de cette diversité est présentée

Figure 10. Le blé tendre ou le froment, *Triticum aestivum* est majoritairement utilisé en France pour faire du pain. Il a été domestiqué il y a 10000 ans au Moyen-Orient et a été dispersé dans le monde entier (Bonnot, 2016). Son génome AABBDD contient les génomes complets de trois espèces (Figure 11). Il est le résultat d'évènements de polyploïdisation et d'hybridation. L'hybridation des génomes BB (*Aegilops speltoides*) et AA (*Triticum urartu*, le petit épeautre sauvage) ont donné l'Emmer sauvage *T. dicoccoides* BBAA. Cette espèce cultivée il y a 10000 ans a évolué en *Triticum dicoccum*. L'hybridation de ce *Triticum dicoccum* avec *Aegilops tauschii* a donné naissance au blé tendre. Son génome complet a récemment été séquencé et annoté (Appels et al., 2018; Dubcovsky and Dvorak, 2007; Luo et al., 2018).



Figure 10. Epis de *Triticum* et *Hordeum* illustrant la diversité phénotypique

De gauche à droite, *Triticum dicoccum* (blé amidonnier), *Triticum aestivum* (blé tendre), *Hordeum vulgare* (orge), T. *monococcum* (engrain nu), *Triticum polinicum* (blé de Galice), *Triticum pedropavlovski*, *Triticum turgidum* (blé miracle), *Triticum militere*, *Triticum turanicum* (blé Kamut ou Khorasan), *Triticum sinskajae* (engrain nu), *Triticum spelta* (grand épeautre), *Triticum durum* (blé dur), *Triticum urartu* x *Aegilops speltoides*, *Triticum turgidum* (blé poulard d'Australie). Collection de Lili et Christophe Moyses, Ferme Moyses, Feldkirch (68). Photo personnelle.

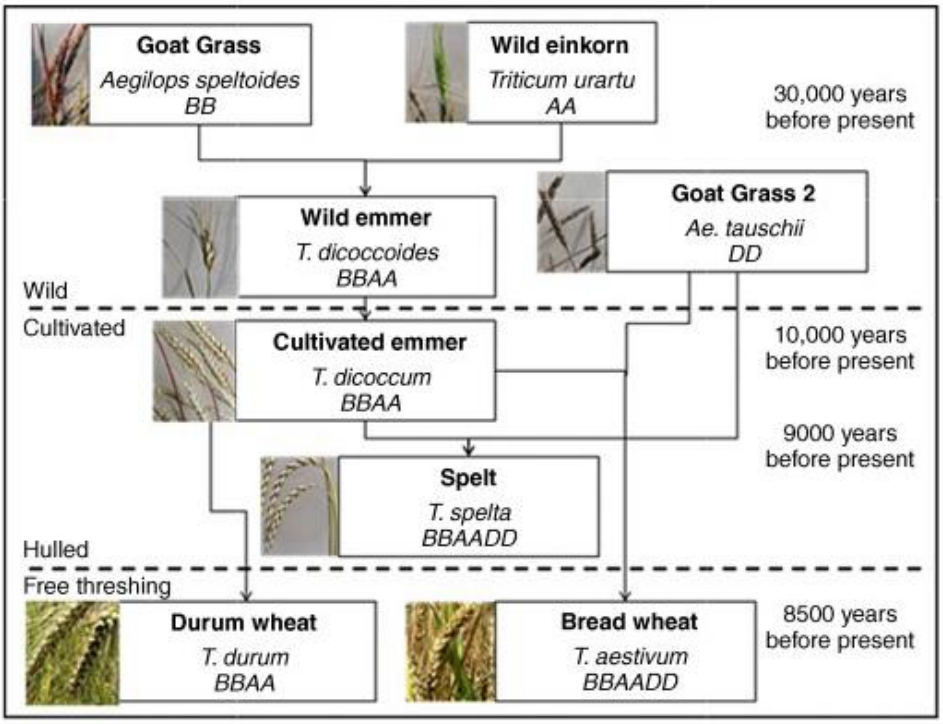


Figure 11. Généalogie des blés
(Source Jérome Enjalbert)

Les blés ont subi une forte perte de diversité génétique, suite à la sélection par paysans et semenciers des blés cultivés (Haudry et al., 2007; Peng et al., 2011). La sélection des variétés de blés tendres utilisées en France au XXe siècle a notamment eu tendance à l'homogénéisation génétique des variétés cultivées dans ce pays (Bonnin et al., 2014). Cette perte est associée à l'essor d'une agriculture modernisée industrialisée. Avec les changements globaux, la prise de conscience de l'importance de préserver la biodiversité a conduit au développement et à l'utilisation d'indicateurs de suivi de cette biodiversité. Ils permettent de mesurer son état et évaluer ses changements aux niveaux international et national (Goffaux et al., 2011). En France, avec l'adoption en 2004 de la stratégie nationale pour la biodiversité (SNB), différents indicateurs ont été construits pour informer le public sur l'état et l'évolution de la biodiversité sur le territoire métropolitain et d'outre-mer (Goffaux et al., 2011; Perronne and Goldringer, 2018).

2.2. Le grain de blé

Le grain de blé est aussi appelé caryopse. Il comporte trois parties distinctes, l'albumen, l'embryon et les enveloppes (Figure 12). Les enveloppes sont, de l'extérieur vers l'intérieur, le péricarpe, le tégument et l'épiderme (Roussel et al., 2002).

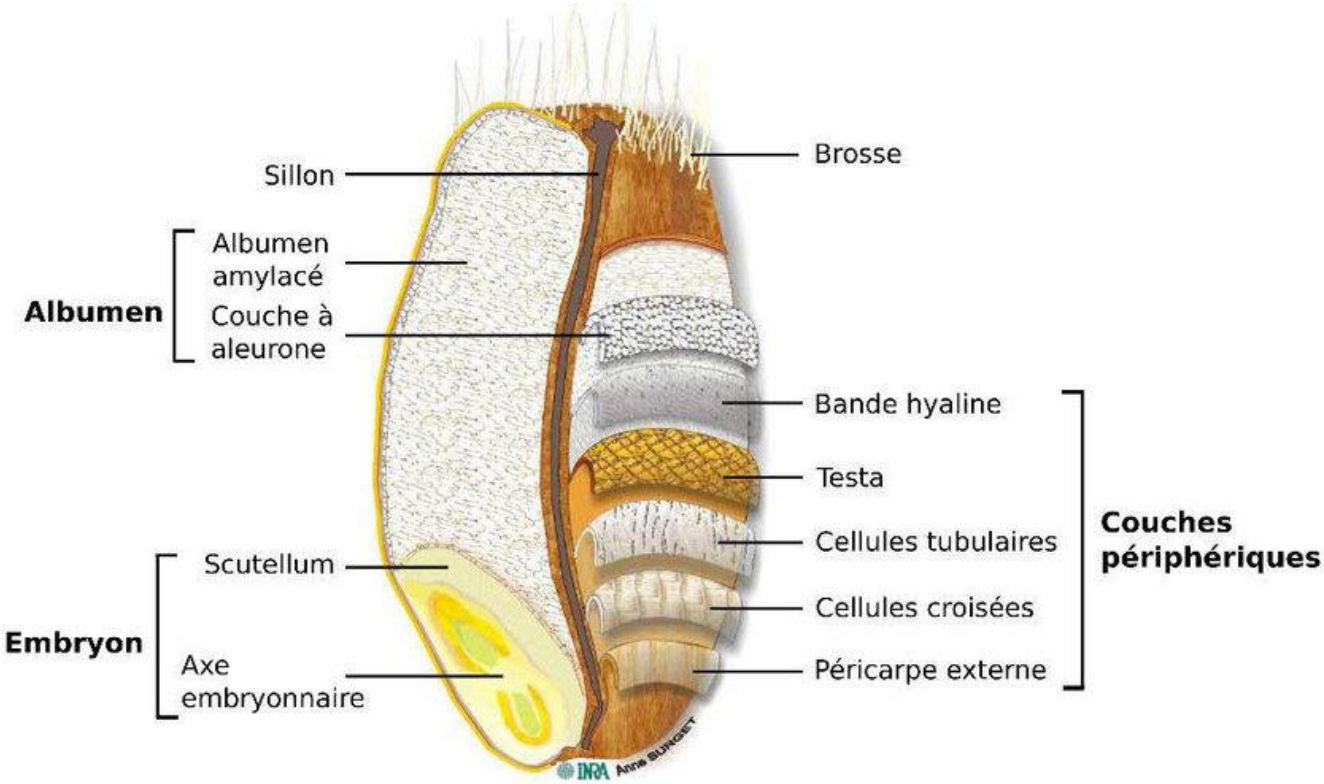


Figure 12. Schéma d'un grain de blé en coupe d'après Surget et Barron (SURGET and BARRON, 2005)

L'embryon (le germe), qui représente environ 3% du grain de blé, contient des lipides, de protéines, de vitamines et d'éléments minéraux (Table 1). Il est éliminée dans les farines courantes raffinées (de type T45-T55) et se retrouve dans les sons et les farines semi-complètes ou complètes (Joubert, 2017). Les enveloppes (13 à 15 % du grain) sont constituées du péricarpe (4 %) et du tégument séminal (2 %) riches en cellulose et éléments minéraux, ainsi que de l'assise protéique (7 à 9 %) riches en protéines, en lipides, en vitamines et en composés minéraux. Ces différentes couches sont bien soudées entre elles et représentent une membrane souple et difficile à briser. Ces enveloppes sont, elles aussi, faiblement incorporées dans les farines blanches et se retrouvent dans les sons. L'albumen amylacé représente 82 à 85% du grain. Elle est constituée de glucides (principalement d'amidon), de protéines (10 à 12%) et d'éléments minéraux en faibles proportions (0,3 à 0,6 %). Cette partie du grain est la plus utilisée pour fabriquer les pains courants (Feillet, 2000; Joubert, 2017).

	% dans le grain				% dans le tissu			
	Péricarpe	Couche à aleurone	Albumen amylacé	Germe	Péricarpe	Couche à aleurone	Albumen amylacé	Germe
Amidon	0,0	0,0	100	0,0	0,0	0,0	82,0	0,0
Protéines	4,4	15,3	73,5	6,8	10,0	30,0	12,0	31,0
Pentosanes	35,1	43,8	18,3	2,8	43,0	46,0	1,6	7,0
Cellulose	87,1	7,6	3,1	2,2	40,0	3,0	0,1	2,0
Lipides	0,0	23,6	62,9	13,5	0,0	9,0	2,0	12,0
Sucres réducteurs	0,0	0,0	62,7	37,3	0,0	0,0	1,8	30,0
Minéraux	22,6	43,6	22,6	9,7	7,0	12,0	0,5	6,0

Table 1. Distribution histologique des principaux constituants du grain de blé (%) D'après Feillet, 2000 et Joubert

2.3. Les méthodes de culture du blé

Les systèmes de cultures ont favorisé deux types de blé : le blé d'hiver et le blé de printemps. Pour le blé d'hiver, les semis sont faits dès octobre, la germination est favorisée au contact de l'humidité de la terre en novembre et la levée des pousses se fait au cours du mois de décembre, janvier. Après le tallage au mois de mars, les blés croissent, c'est la montaison, puis l'épiaison. Les blés matures sont récoltés en été (juin-juillet-août). Le blé de printemps est quant à lui semé au printemps et récolté en août. Il n'a pas besoin de vernalisation et peu ou pas de tallage. En France, les calendriers sont décalés en fonction de la localisation géographique et des années. La moisson se fait vers Montpellier début juillet, en Bretagne, la récolte se fait plutôt fin juillet - début août et en Aveyron sur l'Aubrac la récolte se fait mi-août.

2.4. Les micro-organismes liés à la graine

Les graines hébergent un microbiote complexe dont une communauté bactérienne provenant de l'anthosphère, la carposphère ou des cônes de gymnospermes et des tissus propres de la plante après une longue colonisation du sol aux organes reproducteurs (Rodríguez et al., 2018). La domestication des plantes a été reconnue comme un important moteur de la diversité microbienne (Berg and Raaijmakers, 2018). La composition de ce microbiote peut impacter la qualité de la graine et finalement la valeur sélective de la plante (Shade et al., 2017). En effet, la transmission des micro-organismes dans les graines peut influencer la composition primaire

du microbiote de la plante et contribuer à des degrés divers à l'évolution du microbiote de la plante au cours de son développement (Hardoim et al., 2015). Différentes revues de littérature décrivent les communautés bactériennes (Truyens et al., 2015), fongiques (Porras-Alfaro and Bayman, 2011) et des oomycètes (Thines, 2014) associées aux graines (Figure 13).

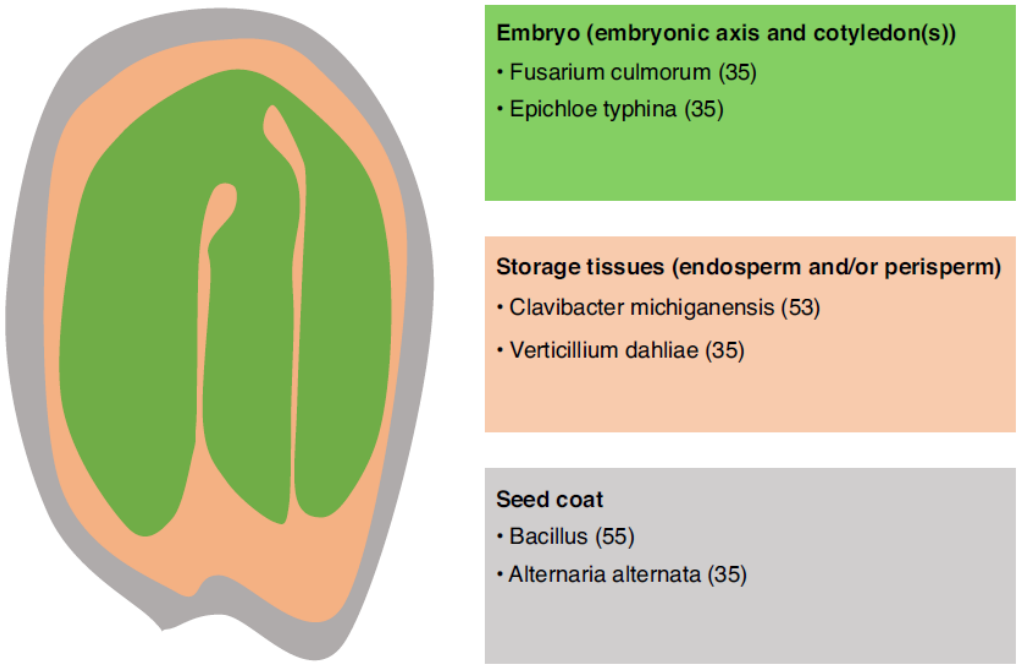


Figure 13. Localisation de quelques micro-organismes associés à la graine (Shade et al., 2017)

Les bactéries retrouvées dans les graines appartiennent fréquemment aux phyla *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Bacteroidetes* (Barret et al., 2015a; Johnston-Monje and Raizada, 2011). Concernant la flore associée aux grains de blés, une étude a examiné la nature des communautés bactériennes et fongiques épiphytes associées à des espèces de *Brassica* et *Triticum*. Cette étude montre que les espèces de chaque genre de plantes hébergeaient une communauté microbienne propre. Les communautés bactériennes des *Brassica* et *Triticum* étaient constituées des espèces dominantes appartenant aux *Proteobacteria* (e.g., species of *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Massilia*, *Xanthomonas*, and *Telluria*), et des espèces fongiques appartenant aux genres *Alternaria*, *Fusarium* et/ou au phylum *Ascomycota* (Links et al., 2014).

Le terroir est un des moteurs de l'assemblage des communautés microbiennes associées aux plantes. Des chercheurs ont travaillé avec des grains de *Phaseolus vulgaris L.* (haricot

commun) afin d'évaluer l'influence des génotypes et du terroir sur le microbiote des graines (Klaedtke et al., 2016). Ils ont utilisé cinq variétés sur deux terroirs situés dans deux zones climatiques contrastées. Ils ont analysé la diversité génétique des cultivars par microsatellites et l'évaluation des assemblages microbiens par séquençage MiSeq (16S région V4 pour les bactéries et ITS1 pour les champignons). Ils ont montré un impact réduit du cultivar sur les assemblages bactériens et fongiques et surtout un effet significatif du site expérimental sur la structure des assemblages bactériens et fongiques. A notre connaissance, aucun analyse ne décrit actuellement l'effet du terroir sur le microbiote des *Triticum*.

3. Les farines

3.1. Les méthodes de fabrication de la farine

La meunerie permet de passer du blé à la farine par trois grandes étapes : le nettoyage, le mouillage et la mouture (Roussel et al., 2002).

Le nettoyage permet d'éliminer les impuretés (poussières, cailloux, pailles…). Les principales machines de nettoyage sont le nettoyeur-séparateur, l'épierreur, le tarare et l'épointeuse. Le nettoyeur-séparateur trie les cailloux par dimension à l'aide de tamis. L'épierreur sépare les pierres du blé par densité. Le blé passe sur un tamis à coussin d'air et est soufflé vers la sortie et les pierres évacuées. Le tarare sépare les produits par densité. Le grain est déversé en flot constant dans un canal d'aspiration dans lequel un courant d'air ascendant permet d'enlever les poussières et les petites pailles. Enfin l'épointeuse agit par friction en poussant le grain à l'aide de brosses contre des grilles rugueuses. Cette dernière étape permet d'enlever les très fines particules fixées sur le grain et permet un meilleur mouillage. A l'aide des caméras infrarouges, le trieur optique, installé depuis peu en meunerie, trie les grains par spectrophotométrie.

Le mouillage est l'étape qui consiste à ajouter de l'eau pour faciliter la séparation entre l'enveloppe et le grain de blé. L'humidité du blé doit être comprise entre 15 et 18%, selon les caractéristiques du lot. Le blé est ensuite mis au repos, afin de séparer plus facilement l'amande farineuse des enveloppes.

La mouture permet de séparer les 3 constituants du grain de blé que sont l'amande farineuse, l'enveloppe et le germe et de réduire les particules d'amande en farine par trois opérations : *i)* le broyage permet l'ouverture du grain et curage de l'amande farineuse sur

l'enveloppe, *ii)* le claquage la réduction des semoules en farine et *iii)* le convertissage la réduction des fines semoules, finots, en farine. Après chaque passage entre les cylindres, les produits sont tamisés par un plansichter afin de les classer selon leur granulométrie et de les diriger sur la machine ou cellule correspondante (Roussel et al., 2002). De cette mouture, sortent la farine et les issues constitués de gros sons, fins sons, remoulage bis, remoulage blanc, et germes. La composition comparée de ces différentes fractions est présentée en Table 1.

Le décret n°63-720 du 13 juillet 1963, détermine les différents types de farine et le taux de cendres correspondant, exprimé en pourcentage de matière sèche. Le taux de cendres des farines est le rapport de la masse de cendres restantes après incinération d'une masse de farine pendant une heure à 900°C (méthode de détermination décrite dans la norme AFNOR NF V 03-720 / Méthode A de la norme ISO 2171). Il existe 6 types de farines homologuées pour le blé, associées à un taux de cendres (Table 2). Le taux de cendres de la farine est une indication de la teneur en minéraux de la farine. Une farine de type T45 sera blanche, raffinée mais avec un teneur en minéraux très modeste. Une farine type 110 contiendra plus de fibres et de minéraux, contenus principalement dans le son.

Type de farines de blé	Taux de cendres
Type 45	Inférieur à 0,50 %
Type 55	De 0,50 à 0,60 %
Type 65	De 0,62 à 0,65 %
Type 80	De 0,75 à 0,90 %
Type 110	De 1,00 à 1,20 %
Type 150	Supérieur à 1,40 %

Table 2. Les 6 types homologués de farines pour le blé par rapport au taux de cendres (Roussel et al., 2002)

3.2. Les protéines de la farine

Les protéines de la farine sont traditionnellement classées selon leur solubilité dans l'eau (Feillet, 2000) (Figure 14). Elles sont composées de 80 à 85% de protéines de réserves, les gliadines et les gluténines insolubles dans l'eau et de 15 à 20% de protéines cytoplasmiques, les albumines et les globulines, solubles dans l'eau. Les gliadines représentent 30 à 40% des

protéines totales du blé et sont solubles dans l'éthanol à 70% (Classification d'Osborne 1907). Ce sont des protéines monomériques (Poids moléculaire = 25 à 75000 Dalton). Elles peuvent être classifiées en deux catégories : *i)* Les α-gliadines, β-gliadines, γ-gliadines avec des prolamines riches en souffre participant au réseau de gluten ; *ii*) Les ω-gliadines qui n'ont pas d'acides aminés soufrés (cystéine ou méthionine) et donc n'ont pas la possibilité de faire des liaisons disulfures. Elles ne participent pas au réseau de gluten. Elles sont principalement localisées dans l'albumen et l'endosperme du blé. Elles sont responsables de la viscosité de la pâte. Les gluténines (40 à 50%) sont des protéines agrégées (Poids Moléculaire > 100 000 Da) et solubles dans les solutions acides. Ces protéines, gliadines et gluténines, font partie du réseau du gluten élaboré lors du pétrissage et créent des ponts disulfures. Elles sont retrouvées dans l'albumen du grain et confèrent à la pâte à pain ses propriétés d'élasticité, sa cohésion, sa ténacité et sa résistance aux déformations. Elle détermine alors la force boulangère. Le ratio gluténine/gliadine permet de déterminer rapidement les caractéristiques d'une pâte. Les albumines (5 à 10% des protéines totales du blé) sont globulaires et solubles dans l'eau, alors que les globulines (5 à 10% des protéines totales du blé) sont solubles dans les solutions salines diluées et sont principalement localisées dans la périphérie du grain et dans le germe.

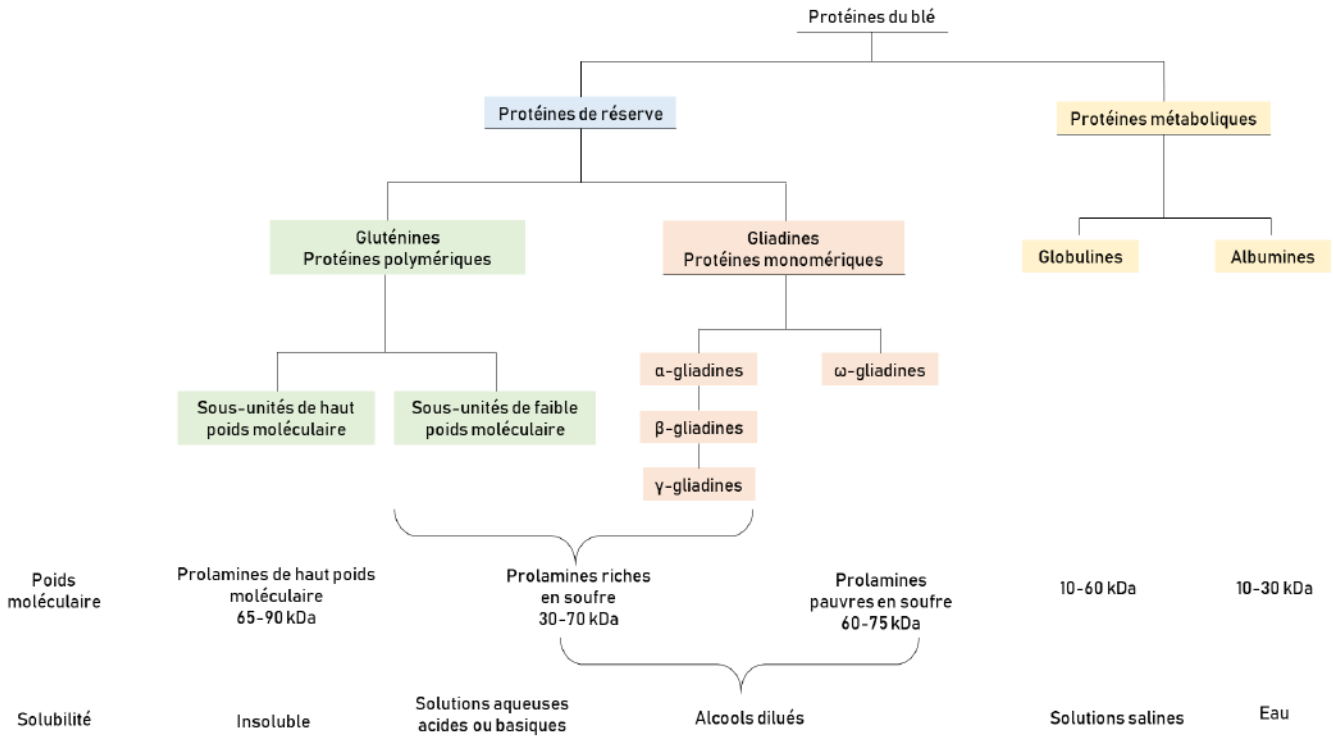


Figure 14. Composition des protéines du blé selon la classification d'Osborne (1907) et Shewry (1986) (Joubert, 2017; Shewry et al., 1986)

3.3. La fraction glucidique de la farine

L'amidon est le constituant majoritaire du grain de blé (70%), il est concentré dans l'albumen amylacé où il sert de polymère de réserve pour la plantule en début de germination (Joubert, 2017). C'est un polysaccharide constitué de molécules de glucose sous forme de deux macromolécules différentes : l'amylose et l'amylopectine. L'amylose compose 25 à 30% de l'amidon. Ce polymère est constitué de 500 à 6000 molécules de D-glucose liées par des liaisons glycosidiques α (1-4) de façon linéaire. Son poids moléculaire varie de 100 à 1000 kDa. L'amylopectine est également un polymère de D-glucose mais ses dizaines de milliers de molécules sont structurées de manière ramifiée par des liaisons α (1-4) et α (1-6). Son poids moléculaire est plus élevé que celui de l'amylose (de 10 000 à 100 000 kDa). Amylose et amylopectine interagissent par des liaisons hydrogènes formant ainsi un grain compact (Joubert, 2017).

3.4 Les minéraux de la farine

Les minéraux du blé (1,5-2,5%) sont principalement localisés dans la couche à aleurone et le germe. Une étude a analysé la teneur en minéraux sur 136 échantillons de blé d'hiver en spectrométrie de masse à plasma induit (Spiegel et al., 2009). Ils se composaient notamment de magnésium (872-1555 µg/g), de zinc (16.7-37.5µg/g), de fer (18.4-65.1µg/g), de manganèse (15.3-56µg/g), de cuivre (2.09-5.80µg/g), de phosphore (2612-4485 µg/g), de potassium (2346 – 4153 µg/g), de calcium (197-420) et de sodium (0.5-16.4). L'acide phytique, sous forme de phytate, constitue la principale forme de stockage du phosphore et est complexé aux minéraux tels que le fer et le zinc dont il réduit la biodisponibilité. Ce composé est principalement présent dans la couche à aleurone (Morrison et al., 1975).

3.5. Les micro-organismes de la farine

Peu d'articles parlent du microbiote des farines de blé. La concentration en micro-organismes reste modeste, entre 10^1-10^5 CFU par gramme de farine (Alfonzo et al., 2017; Berghofer et al., 2003; Minervini et al., 2015a). Des études en méthode culture- dépendante ont montré que le son contenait pour les mycètes, les espèces ou genre *Aspergillus glaucus*, *A. flavus-oryzae group* (actuellement *Aspergillus flavus var. oryzae*), *Penicillium sp.*,

Flavobacterium, *Bacillus sp*., *Achromobacter*, *Micrococcus candidus* (actuellement *Staphylococcus epidermidis*), *Alcaligenes faecalis*, et *Serratia sp*. ; le genre *Alternaria* dans la farine de blé nettoyé (Hesseltine and Graves, 1966).

Un autre article a décrit par profil RAPD des ADN de souches isolées bactériennes, les espèces *Enterococcus casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. mundtii*, *L. garvieae*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis*, *Lb. curvatus subsp. curvatus* and *Lb. graminis* dans les grains de blé dur, dans le son et dans des farines non-conventionnelles (Corsetti et al., 2007). Plus récemment, les espèces *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Leuconostoc citreum*, *Weissella cibaria*, *Pediococcus pentosaceus* dans des farines de blé dur et *L. sanfranciscensis* et *Ln. citreum* dans des farines de blé tendre (Minervini et al., 2018a).

Pour décrire la flore des farines de blé, une étude plus récente a utilisé des méthodes de métabarcoding sur cDNA après une extraction d'ARN de filtrat de farine et une transcription reverse (Minervini et al., 2015b, 2018b, 2018a). Des fragments de 520 paires de bases de la région V1-V3 de l'ADNr 16S sont amplifiés pour détecter les bactéries, un fragment de la région 18S pour détecter les champignons et un fragment du gène ADNr 16S pour analyser la diversité au sein des *Firmicutes*. Pour les bactéries, sept phyla ont été décrits, avec une dominance des *Proteobacteria* (67%). Au sein des *Firmicutes*, la farine contient des bactéries de famille ou de genre *Bacillaceae* (genera *Bacillus* and *Anoxybacillus*), *Paenibacillaceae* (*Paenibacillus*) and *Enterococcaceae* (*Enterococcus*), *Sphingomonas*, *Massilia* et *Erwinia*. Le genre *Lactobacillus* n'est pas dominant dans les farines mais le nombre d'espèce détectées dans ce genre est important, incluant *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus parabrevis*, *L. plantarum*, *Lactobacillus pontis* et *Lactobacillus reuteri* et *Lactobacillus sanfranciscensis*. Au niveau des champignons, les auteurs indiquent que les trois phyla *Ascomycota*, *Basidiomycota*, and *Microsporidia* ont été retrouvés. Le phylum *Microsporidia* est dominant alors que les *Ascomycota* sont peu présents. Ils ont identifié plus précisément *Systenostrema alba* comme OTU (Operational Taxonomy Unit) dominant dans les farines. Notons que la classification des *Microsporidia* a été très débattue. Ces parasites intracellulaires sont maintenant classés dans le règne des protozoaires plutôt que dans le règne des champignons (Ruggiero et al., 2015). Très récemment, l'équipe de Minervini et al (2018) a décrit une flore de farine contenant des espèces du genre *Pseudomonas*, *Erwinia*, de la famille des *Enterobacteriaceae* et l'espèce *Lactobacillus sanfranciscensis* dans des farines de blé dur et de blé tendre (Minervini et al., 2018b).

4. Les levains de panifications

4.1. Définition du terme levain

Le levain est une pâte fermentée issue d'une fermentation naturelle de farine et d'eau, avec la présence de bactéries et de levures (De Vuyst et al., 2014a, 2017; Gobbetti et al., 1994; Huys et al., 2013; Siepmann et al., 2017). Il est produit tout autour du monde et fait du pain un des aliments fermentés principaux de l'alimentation (Tamang et al., 2016). Il est utilisé pour faire lever le pain, mais aussi permet une augmentation de la durée de conservation du pain, de la qualité nutritionnelle et permet une flaveur spécifique (Banu et al., 2011; Gobbetti and Gänzle, 2012a; Hansen and Schieberle, 2005; Huys et al., 2013). Comme mentionné au paragraphe 1.2.3., la législation française rappelle que « le levain est une pâte composée de farine de blé et de seigle, ou de l'un seulement de ces deux ingrédients, d'eau potable, éventuellement additionnée de sel, et soumise à une fermentation naturelle acidifiante, dont la fonction est d'assurer la levée de la pâte ».

Avec plus de 1266 références bibliographiques dont 1070 articles sur le sujet (Source : Scopus, 22/09/18), les levains sont en vogue dans le domaine des sciences biologiques et agronomiques, mais aussi en immunologie et biochimie (Figure 15).

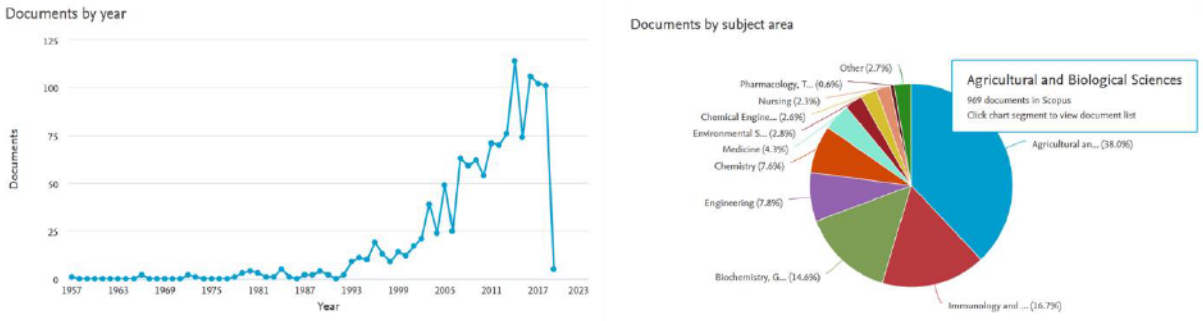


Figure 15. Analyse Scopus du mot « sourdough »

4.2. Les différents types de levain

Les levains peuvent être classifiés en trois groupes plus un (Corsetti, 2013; De Vuyst and Neysens, 2005; Onno, 1994; Stolz and Böcker, 1996). Les levains de type I, ou levain traditionnel, les levains de type II ou levain rapide, les levains de type III ou levain déshydraté-congelé et les levains de type IV utilisés au laboratoire (Table 3).

Les levains de type I sont habituellement produits par des méthodes traditionnelles, avec une fermentation spontanée par une flore microbienne endogène naturelle (Siepmann et al., 2017). La sélection des micro-organismes se fait au cours des rafraîchis, où l'artisan mélange de l'eau et de la farine au levain. Ce type de levain est utilisé majoritairement par les artisans-boulangers traditionnels. Ils sont liés aux pratiques des boulangers, typiques et diversifiés.

Les levains de type II sont produits par un process connu et par des méthodes industrielles sous forme liquide. Des starters d'une espèce de bactérie et de levure connus sont mélangés en proportion définie. Cette addition de starter acidifie rapidement la pâte, au travers d'un seul rafraîchi. Ces levains sont utilisés surtout pour l'acidification de la pâte. La fermentation doit être menée à une température dépassant les 30°C pour une acidification plus rapide et une inhibition de la croissance des levures endogènes (Corsetti, 2013; Gobbetti, 1998). La levée de la pâte est assurée par l'ajout de levure starter.

Les levains de type III ou levains secs sont sous forme de poudre. Ce sont des levains secs inactifs (sans activité fermentaire) ou actifs. Ces levains contiennent principalement des bactéries lactiques. L'ajout de levure starter, comme *Saccharomyces cerevisiae*, « la levure de boulanger » est nécessaire pour faire lever la pâte. Les types de levains sont résumés dans le Table 3 (Lhomme, 2015; Lhomme et al., 2016a). Au cours de ma thèse, nous nous intéressons seulement aux levains de type I.

4.3. La flore microbienne et son action fermentaire

Un levain peut être un écosystème dit « simple » composé de quelques espèces ou une communauté microbienne plus diverse (Minervini et al., 2014). Le levain est un écosystème caractérisé par un pH acide, une concentration élevée en carbohydrates et une limitation en oxygène (De Vuyst et al., 2014a). La bibliographie rapporte que le levain contient généralement 10^8-10^9 UFC/g pour les bactéries lactiques et 10^7 UFC/g pour les levures (De Vuyst et al., 2017). Des études considèrent généralement qu'il existe un ratio de 100 bactéries pour 1 levure. De nombreux facteurs exogènes et endogènes interviennent dans la dispersion, sélection et maintien de la communauté microbienne (cf 4.3.4).

	Levain de type I	Levain de type II			Levain de type III	Levain de type IV
		Ferments commerciaux				
	Levain traditionnel	Préferments	Préparation microbienne sèche		Levain déshydraté	Levain Mélangé Laboratoire Starters
		Levain liquide	Bactéries lactiques	Starter mixtes		
Flore présente	Flore microbienne endogène naturelle, active	Souches de bactéries lactiques et levures sélectionnées	Une ou plusieurs espèces de bactéries lactiques	Une ou plusieurs espèces de bactéries lactiques et de levures	Obtenu après séchage d'un levain naturel ou élaboré par starter	Une souche commerciale de levure, culture starter de bactéries lactiques
Fonction	Agent naturel de fermentation	Agent de fermentation mixte, issu d'une sélection	Permet une préfermentation acide	Agent de fermentation mixte, issu d'une sélection	Ingrédient permettant d'enrichir l'aspect aromatique de la pâte	Travail en laboratoire, Contrôle des paramètres de fermentation
Contraintes	Variabilité dans l'activité Coût de main d'œuvre élevé	Achat, Conservation à basse température	Achat Ajout de levure dans la pâte	Achat Conduite d'une préfermentation en culture mixte	Pas d'activité fermentaire	Achat La culture starter peut être moins compétitive que la flore endogène
Atouts	Typicité Diversité	Praticité d'emploi Actif	Préparation sèche, concentrée Choix de souches possible	Préparation sèche, concentrée Praticité	Utilisation simple	Rafraichi au laboratoire Choix de souches
Statut (selon le décret pain)	Appellation levain	Appellation levain	Pas d'appellation levain	Appellation levain	Pas d'appellation levain	Pas d'appellation levain

Table 3. Les différents types de levain adapté de (Onno et al., 2009), (Lhomme et al., 2016a; Siepmann et al., 2017)

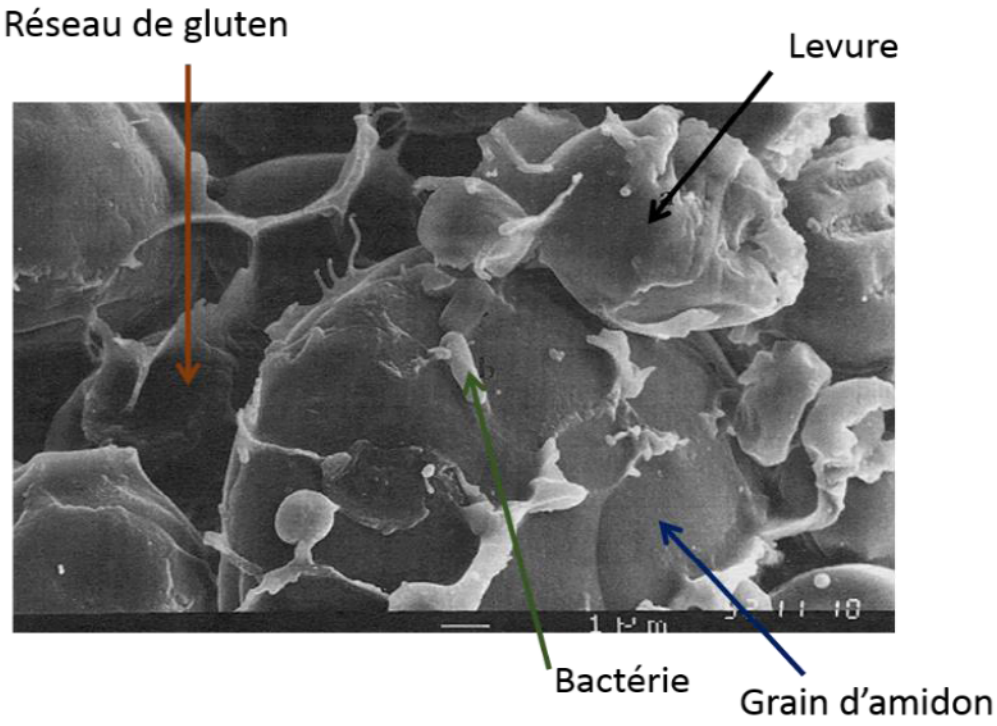


Figure 16. Coupe d'un levain en microscopie électronique d'après Onno et al., 2009

4.3.1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB = Lactic Acid Bacteria) sont définies historiquement comme un groupe d'organismes micro-aérophiles, Gram positif pouvant fermenter les hexoses pour produire de l'acide lactique. Cette classification fonctionnelle inclut les genres *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. Ils ont une forme de coque, coccobacilles ou encore bacilles et sont retrouvés dans de nombreux habitats, plantes, aliments, hommes (Makarova et al., 2006). Parmi les différents genres de bactéries lactiques, seuls *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leucostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et W*eissella* ont une grande importance en fermentation alimentaire et ont le statut « GRAS » (Generally Recognized As Safe) (Wessels et al., 2004). Parmi tous ces genres, les *Lactobacillus* sont les plus souvent retrouvés dans les levains de fermentation, ainsi que les genres *Weissella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactococcus* (Huys et al., 2013).

Principal genre retrouvé dans les aliments fermentés et les levains, le genre *Lactobacillus* comprend 232 espèces, un nombre qui continue d'augmenter avec la description

chaque année de nouvelles espèces. Ce sont des bactéries Gram positive, non-motile pour la plupart, catalase négative et non sporulantes. De récentes études de génomique comparative ont révélé le potentiel biotechnologique des *Lactobacilli* (Sun et al., 2015) et des groupes phylogénétiques robustes comme base d'une reclassification (Salvetti et al., 2018). Ils sont retrouvés en association avec la nourriture, les plantes, les animaux vertébrés et invertébrés (Duar et al., 2017) (Figure 17. Arbre phylogénétique du genre *Lactobacillus* (O'Flaherty et al., 2018).

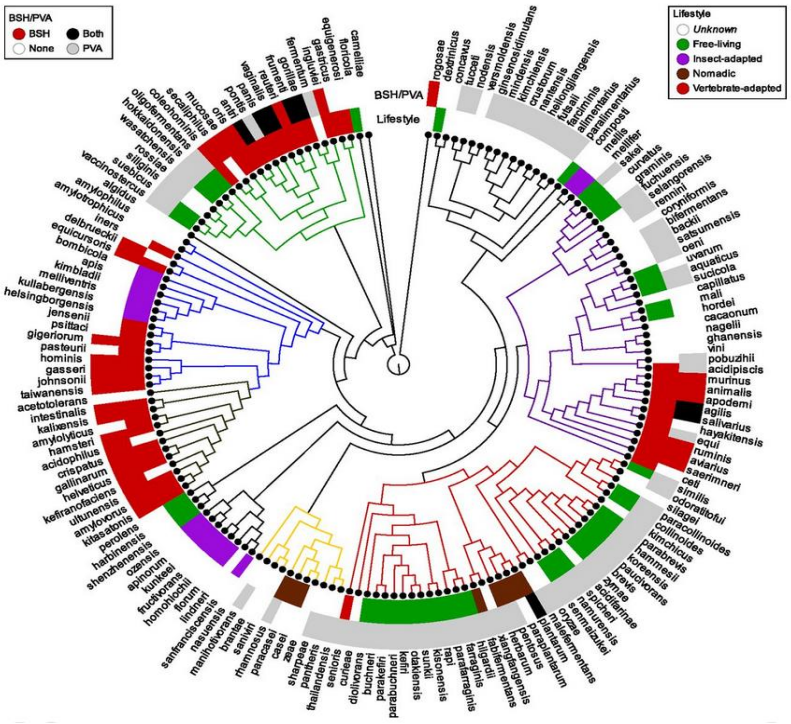


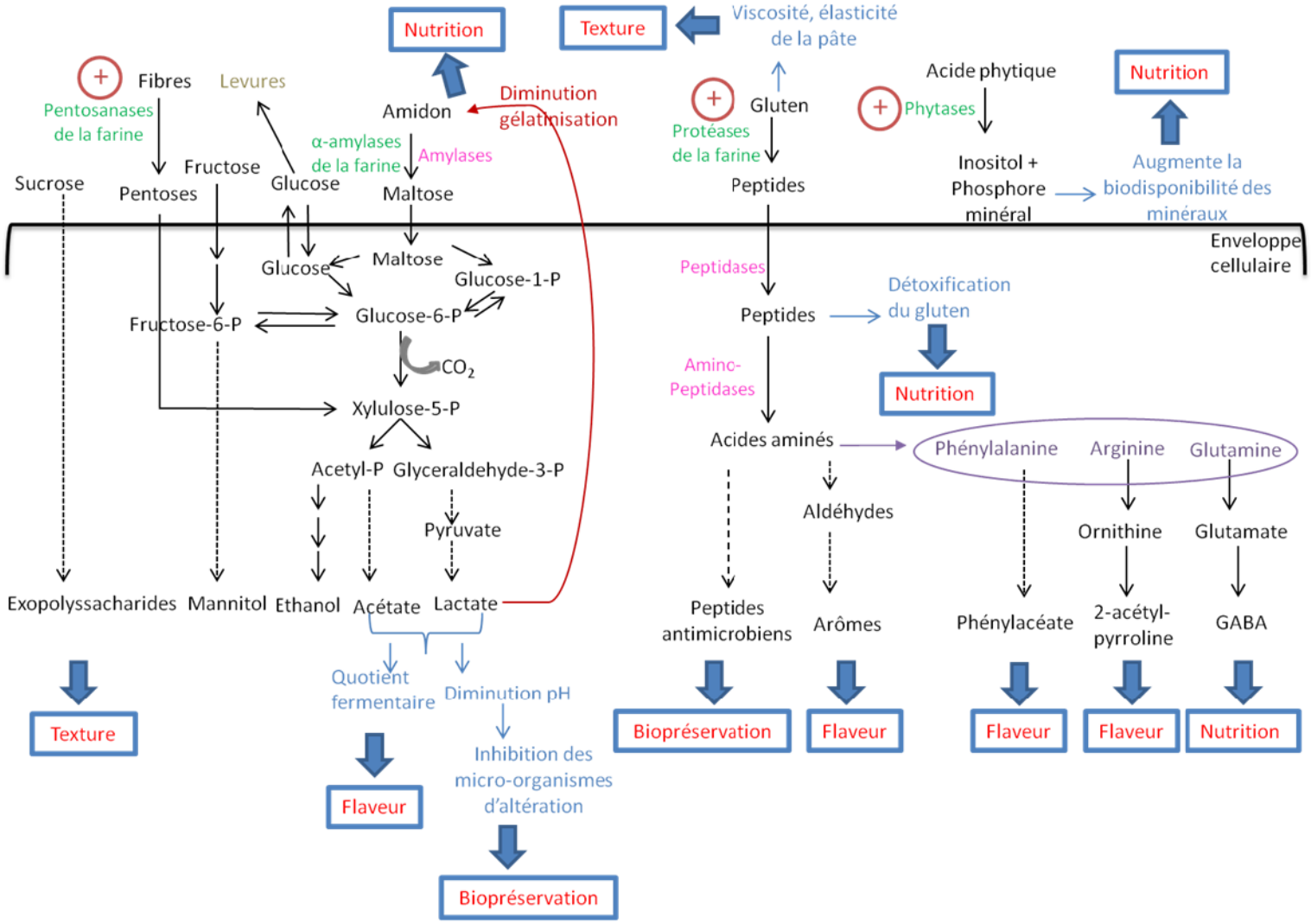
Figure 17. Arbre phylogénétique du genre *Lactobacillus* (O'Flaherty et al., 2018)

Plus de soixante espèces de bactéries lactiques appartenant au genre *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* et particulièrement *Lactobacillus* ont été décrites dans les levains de panification (De Vuyst et al., 2014a, 2014a; Huys et al., 2013; Siepmann et al., 2017). Il est important de noter qu'à l'heure actuelle les bactéries lactiques des levains ont été beaucoup plus étudiées que les levures des levains. Plus précisément, il est possible de recenser de nombreuses études sur les LAB dans les levains de blé et de seigle (De Vuyst et al., 2014a; Siepmann et al., 2017), en Belgique (De Vuyst et al., 2014a; Harth et al., 2016; Meulen et al., 2007; Scheirlinck et al., 2008, 2009; Van Kerrebroeck et al., 2016; Weckx et al., 2010), en Chine (Zhang et al., 2015, 2011), au Danemark (Rosenquist and Hansen, 2000), en Estonie (Viiard et al., 2013), Finlande (Mäntynen et al., 1999), en France (Ferchichi et al., 2007;

Lhomme et al., 2014, 2015a; Michel et al., 2016; Robert et al., 2009a; Valcheva et al., 2006; Vera et al., 2012), en Allemagne (Meroth et al., 2003; Vogelmann and Hertel, 2011; Vogelmann et al., 2009), en Grèce (Paramithiotis et al., 2006, 2010), en Roumanie (Banu et al., 2011), en Turquie (Dertli et al., 2018) et surtout en Italie (Alfonzo et al., 2016; Corsetti et al., 2001, 2003; Gobbetti et al., 1994; Minervini et al., 2012, 2015b, 2018b; Ripari et al., 2016a, 2016b; Rizzello et al., 2010). Les études les plus récentes utilisent des techniques de biologie moléculaire et de séquençage à haut-débit. Leurs génomes sont maintenant séquencés, comme le séquençage de *Lactobacillus reuteri* E81, *L. reuteri* LR5A, *L. rhamnosus* LR2, *L. plantarum* PFC-311, and a novel *Lactobacillus sp.* strain PFC-70, isolés de levains traditionnels turcs (Dertli et al., 2018).

Les bactéries lactiques peuvent être homofermentaires, en fermentant les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof Parnas pour produire exclusivement de l'acide lactique. Elles peuvent être hétérofermentaires obligatoires, en fermentant les hexoses et les pentoses via la voie 6-PG/PK 6- phosphogluconate / phosphocétolase pour produire de l'acide lactique, de l'acide acétique et CO_2. Enfin, elles peuvent être hétérofermentaires facultatives, fermentent les hexoses via Embden-Meyerhof et les pentoses via la voie 6-PG/PK. Leur métabolisme impacte la qualité du pain, notamment dans la formation de l'acétate, dans la régénération des cofacteurs réduits (Gänzle et al., 2007). En produisant des acides, elles abaissent le pH de la pâte et provoque l'activation des protéases de la farine qui vont dégrader des protéines en peptides (Vermeulen et al., 2005). Elles sont également capables de produire des composés volatiles pouvant impacter la flaveur du pain (Gobbetti, 1998). Leur métabolisme joue alors un rôle dans la flaveur du pain, la texture, les qualités nutritionnelles et la préservation du pain.

La bactérie *L. sanfranciscensis* a été découverte dans un levain de San Francisco (USA) et décrite comme l'espèce dominante des levains de panification (Gobbetti et al., 1996). Elle est hétérofermentaire obligatoire. La souche *L. sanfranciscensis* TMW 1.1304 a été séquencé et a révélé un chromosome circulaire de 1.298.316 paires de bases (pb) et deux plasmides de 58.739 et 18.715 pb respectivement (NCBI, ID 172611) (Vogel et al., 2011). Plusieurs études ont révélé une diversité intra-spécifique importante (Kitahara et al., 2005; Lhomme et al., 2016b; Picozzi et al., 2010). Par exemple, l'étude de 49 souches isolées de levains français et typées en MLST (Multilocus Sequence Typing) et PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis) sur plusieurs gènes indique qu'il existe une diversité faible entre souches isolées d'un même levain et une grande diversité entre les souches isolées de différents levains. Cela suggère une influence des pratiques boulangères ou conditions environnementales sur la sélection des souches (Lhomme et al., 2016b).



⊕ enzymes activées par la diminution du pH

Figure 18. Schématisation globale et simplifiée des voies métaboliques et des fonctionnalités associées chez les bactéries lactiques des levains de panification (Lhomme et al., 2016a)

4.3.2. Les levures

La levure est un organisme unicellulaire, appartient au règne des *Fungi*. Les levures sont apparues indépendamment plusieurs fois et sont donc polyphylétiques. On les trouve dans le phylum des *Ascomycota* et *Basidiomycota*. Dans le levain, on trouve principalement des *Ascomycota*. Plus de 1700 espèces de levure ont été répertoriées (Vu et al., 2016).

Elles ont un mode de reproduction asexuée et parfois sexuée. Les levures dont la reproduction sexuée n'a pas été détectée, ont été classées dans le genre des *Candida*. Ce genre est polyphylétique, donc des levures de clades très divergents sont dénommées *Candida*. De nouvelles appellations sont régulièrement proposées pour remplacer le nom *Candida* par le nom du clade auquel elles appartiennent. Toutefois ces changements ne sont pas effectués dans les bases de données, ce qui conduit à des difficultés dans les analyses de métabarcoding. Les levures se reproduisent de façon asexuée avec la formation d'un bourgeon ou par scissiparité. Les Ascomycètes capables d'une reproduction sexuée forment des asques qui contiennent des ascospores.

Les levures ont un métabolisme aérobie et pour certaines d'entre elles anaérobie. A l'origine, leur métabolisme était un métabolisme respiratoire aérobie. Au cours de l'évolution, un métabolisme respiro-fermentaire et fermentaire s'est mis en place (Hagman and Piškur, 2015; Hagman et al., 2013; Piškur et al., 2006; Thomson et al., 2005). Chez les *Saccharomycetales*, les levures dites « Crabtree positive » sont capables de fermenter en présence d'oxygène si la quantité de sucre est suffisante (Figure 3). On parle d'une stratégie de « make/accumulate/consume » pour décrire le processus selon lequel elles produisent de l'éthanol au cours de la fermentation quand le glucose est abondant, accumule de l'éthanol puis consomme l'éthanol au cours de la respiration quand le glucose n'est plus suffisant.

Au cours de la fermentation en levain et pâte, elles utilisent des substrats carbonés, des hydrates de carbone simples et des sucres issus de l'activité amylasique pour produire de nombreux composés (Figure 19). Elles transforment le glucose en gaz carbonique et en éthanol. Une partie du CO_2 va être retenu par la pâte en fonction de la capacité de rétention du réseau de gluten, permettant au pain de lever. L'éthanol s'évapore, notamment à la cuisson. Elles produisent aussi d'autres métabolites comme le glycérol, l'acétate qui peuvent être excrétés de la cellule ainsi que de nombreux composés volatiles aromatiques (Figure 19). La production de tous ces composés est espèces et souches-dépendante, offrant une diversité de pains. Certaines levures décrites dans les levains n'ont pas de capacité fermentaire connue, mais peuvent

certainement influencer le fonctionnement de l'écosystème levain en interagissant positivement ou négativement avec d'autres espèces.

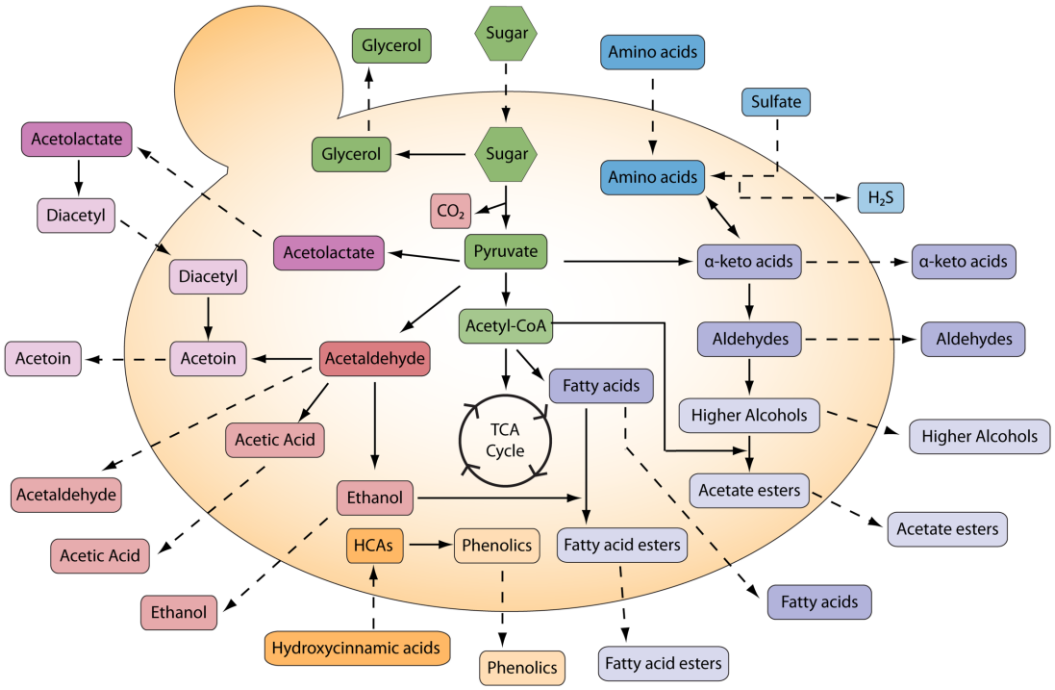


Figure 19. Vue d'ensemble de production des composés aromatiques par la levure (Dzialo et al., 2017)

Actuellement, plus de 30 espèces de levures ont été décrites dans les levains de panification (Carbonetto et al., 2018). Elles appartiennent très majoritairement à la famille de *Saccharomycetaceae*. Les espèces de levures des levains appartiennent au genre *Candida*, *Hyphopichia*, *Kazachstania*, *Kluveryomyces*, *Lachancea*, *Lodderomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Torulaspora* et *Wickerhamomyces* (Almeida et al., 2015; Corsetti et al., 2001, 2003; De Vuyst et al., 2016; Decimo et al., 2017; Desiye and Abegaz, 2013; Foschino et al., 2004; GABRIEL et al., 1999; Garofalo et al., 2008; Gatto and Torriani, 2004; Gobbetti, 1998; Gobbetti et al., 1994; Infantes and Schmidt, 1992; Lhomme et al., 2015a, 2016a; Liu et al., 2018; Mäntynen et al., 1999; Meroth et al., 2003; Minervini et al., 2012, 2015b; Nuobariene et al., 2015; Obiri-Danso, 1994; Pulvirenti et al., 2004; Saeed et al., 2009; Succi et al., 2003; Sugihara et al., 1971; Valmorri et al., 2010; Vernocchi et al., 2004a, 2004b; Vrancken et al., 2010; Zannini et al., 2009; Zhang et al., 2015, 2011). La liste complète est disponible dans le chapitre matériel et méthodes et dans la figure ci-dessous (Figure 20). Une

espèce très présente dans les levains a été renommée *Kazachstania humilis*, anciennement *Candida humilis* ou *Candida milleri* (Jacques et al., 2016).

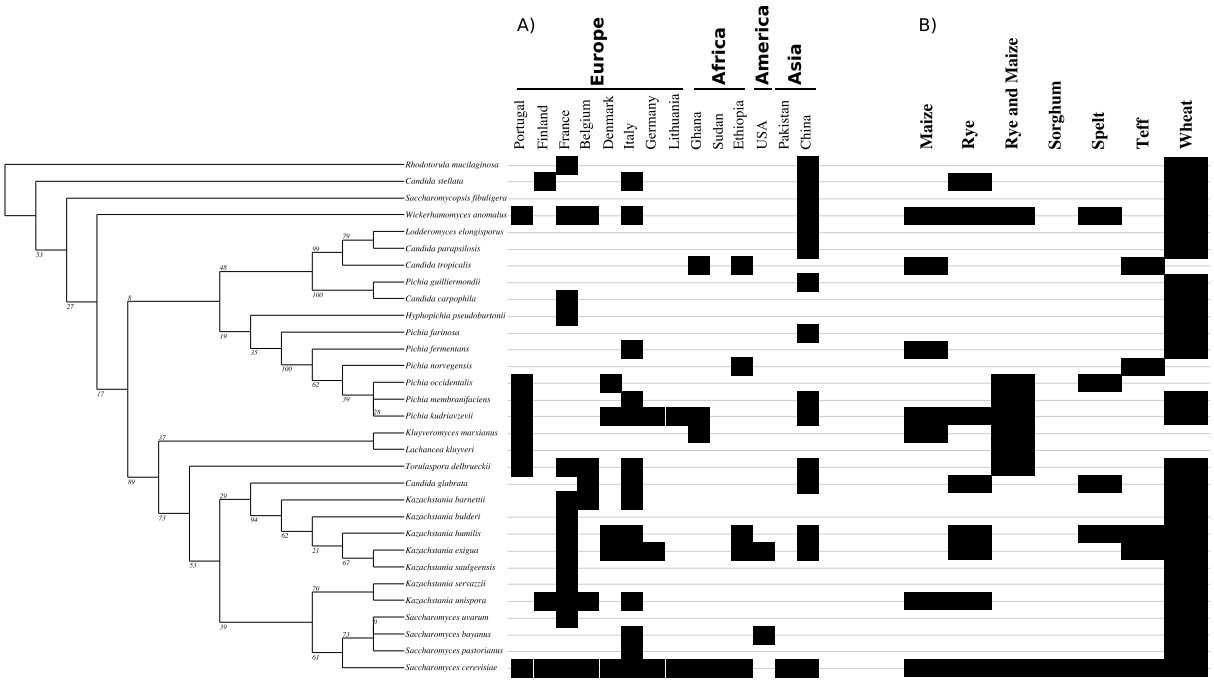


Figure 20. Distributions des espèces de levure rencontrées dans les levains en fonction des pays (A) et des matrices céréalières (B) (Carbonetto et al., 2018)

4.3.3. Les interactions entre les levures et bactéries

Des études récentes montrent que les associations dans un écosystème sont importantes pour chaque membre et en conséquence pour la communauté microbienne totale (Franco and Pérez-Díaz, 2013). Les levures et bactéries sont connues pour interagir dans des aliments et boissons fermentés, comme le vin (Alexandre et al., 2004), le fromage (Mounier et al., 2005) et dans les levains (De Vuyst and Neysens, 2005; Gobbetti and Gänzle, 2012a; Van Kerrebroeck et al., 2017).

Six types d'interactions peuvent être décrites : 1) une interaction négative – négative décrit comme une compétition pour les ressources, 2) une interaction négative – neutre ou amensalisme, 3) une interaction négative – positive, prédation ou parasitisme, 4) une interaction positive – neutre, commensalisme, 5) une interaction positive – positive, mutualisme, 6) une interaction neutre – neutre, neutralisme. Quelques interactions ont été documentées pour les communautés de levures et de bactéries lactiques dans les levains. Cela inclut de la compétition pour les ressources (compétition pour le glucose, aminoacides, etc.), la facilitation via une

alimentation croisée (dégradation du maltose, production de glucose pour la communauté microbienne…) ou encore des interactions positives ou négatives via la production de composés secondaires qui affectent les propriétés chimiques de l'environnement (production d'antibiotiques, acidification du milieu, toxines-killer…).

Dans le levain, et notamment dans les levains de type I maintenus par rafraîchis, on suppose l'existence de relations de facilitation entre certaines espèces de bactéries lactiques et de levures. La facilitation résulte d'un mutualisme, interactions positives entre espèces. Plus il y a d'espèces, plus il y a de chance pour qu'une espèce (ou un groupe fonctionnel d'espèces) modifie l'écosystème d'une manière qui sera bénéfique à la vie, et donc à la productivité d'une autre espèce (ou groupe fonctionnel) (Ramsayer and Sicard, 2015). L'alimentation croisée inclue l'utilisation de métabolites ou de déchets d'une espèce comme nutriment pour une seconde espèce (Seth and Taga, 2014). Par exemple, il a été montré que *S. cerevisiae* secrète de la valine et de la leucine bénéfiques pour *L. plantarum* (Gobbetti et al., 1994). *S. cerevisiae* sécrète également des acides aminés (Ponomarova et al., 2017), hydrolyse le sucrose en glucose et fructose facilitant les bactéries lactiques (De Vuyst and Neysens, 2005; Gobbetti et al., 1994).

Une interaction souvent citée est celle entre *Kazachstania humilis* et *Lactobacillus sanfranciscensis*. *L. sanfranciscensis* maltose-positive hydrolyse le maltose de la farine en glucose et glucose-1-phosphate puis le relargue dans l'environnement, prévenant les concentrations intracellulaires élevées. Le glucose devient alors disponible pour les souches de *Kazachstania humilis* maltose-négative (Gobbetti, 1998; Venturi et al., 2012a). Cependant quelques espèces de *Kazachstania* sont maltose positive (Carbonetto et al., 2018).

En présence de bactéries lactiques, *S. cerevisiae* produit une quantité de gaz carbonique plus importante que lorsqu'elle est seule (Gobbetti, 1998). Plus récemment, il a été démontré que *S. cerevisiae* apporte une atmosphère contenant assez de CO_2 pour la croissance de *Lactobacillus plantarum*. *S. cerevisiae* consomme l'acide lactique, avec comme effet de ralentir l'acidification du milieu et permettre une croissance plus importante des bactéries. Elle secrèterait également un facteur stimulant la croissance de *Lactobacillus sanfranciscensis* (Sieuwerts et al., 2018). Le facteur simulant ne serait probablement pas protéique, sauf une petite protéinase K insensible ou des peptides résistant aux hautes températures. Il ne serait produit qu'en présence de fructose (à toutes concentrations) ou de glucose (concentration supérieure à 2 $g.L^{-1}$).

Pendant la fermentation, bactéries lactiques et levures produisent et relarguent d'autres composés qui ne sont pas des nutriments, pouvant modifier les propriétés physico-chimiques de l'environnement à l'avantage ou désavantage de certaines espèces. L'acide acétique et l'acide lactique produits par les bactéries lactiques et levures peuvent exclure ou inhiber la croissance des bactéries non « lactiques » et des contaminants fongiques en abaissant le pH de l'environnement. Ce changement promeut la croissance des bactéries lactiques et levures adaptées au pH acide. Vogel et Ehmann (1998) ont trouvé que la croissance de *K. humilis* n'était pas affectée par un pH compris entre 3.5 et 7 (Ehrmann and Vogel, 1998). La croissance de deux souches de *L. sanfranciscensis* varie dans cet intervalle de pH avec un optimum d'environ 5.5 (Gänzle et al., 1998). Cependant, la croissance de *K. humilis* et *L. sanfranciscensis* décroit avec l'augmentation des concentrations de lactate ou d'acétate.

Des espèces de bactéries lactiques, comme *L. reuterii*, *L. amylovorus* ou *L. plantarum* sont connues pour produire des antibiotiques ou des bactériocines protéiques (Crowley et al., 2013; De Vuyst et al., 2009; Joerger, 2003). La souche C57 de *L. sanfranciscensis* produit un peptide actif bactériocide contre toutes les espèces de bactéries lactiques et la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes* (Gobbetti, 1998). Cette souche produit également des acides organiques inhibant la plupart des moisissures contaminantes du pain, des champignons et des espèces du genre *Candida*. Les levures produisent aussi des composés toxiques ressemblant à des bactériocines. Quelques souches de *S. cerevisiae* sont connues pour produire des composés avec des activités antibactériennes (Al-Jassaci et al., 2016; Osborne and Edwards, 2007). Le rôle de ces toxines dans les écosystèmes levains n'est pas connu

Au-delà des espèces dominantes, de nombreuses autres espèces, fermentaires ou non, sont présentes dans le levain comme le montre les études de métabarcoding (Michel et al., 2016; Minervini et al., 2015b). Ces espèces rares pourraient aussi produire des composés stimulateurs ou inhibiteurs et rentrer en interaction avec le reste du microbiote.

4.3.4. Les paramètres abiotiques influençant la mise en place du microbiote

La pâte est un écosystème riche en nutriments. Le boulanger initie son levain avec un mélange eau – farine, puis procède à des rafraîchis par ajout régulier d'eau et de farine. De multiples rafraîchis sont alors nécessaires pour obtenir un levain mature. Le levain est riche en carbohydrates complexes comme l'amidon ; leur hydrolyse partielle grâce aux amylases de la farine et à des amylases microbiennes conduit à des disaccharides (maltose) et des monosaccharides (fructose et glucose). En ce qui concerne la source d'azote, les protéines sont

hydrolysées en peptides et en acides aminés libres (FAA = free amino acids) au cours de la fermentation. Ces ressources conditionnent le milieu et la croissance des micro-organismes et donc la mise en place du microbiote. Le potentiel redox diminue graduellement pendant la formation de la pâte, le pH devient acide au fur et à mesure des rafraîchis (autour de 4). Cependant la valeur de l'activité de l'eau (de 0.96 à 0.98) ne limite pas la croissance de la majorité des contaminants microbiens. Du type de farine utilisé dépendra la richesse du milieu en termes de nutriments (minéraux, vitamines, protéines, etc.) et également de pouvoir tampon.

4.3.5. Origines possibles du microbiote des levains

Les aliments fermentés hébergent une communauté de micro-organismes. Ils peuvent provenir naturellement de l'environnement du fournil: ustensiles, pots, vaisselles, table de travail (Bokulich and Mills, 2013; Franz et al., 2014; Minervini et al., 2015b; Tamang et al., 2016), des ingrédients, du boulanger ou d'addition de starter qui modifie les qualités organoleptiques des produits. D'où pourrait alors venir la flore des levains ?

4.3.5.1. Le terroir : microbiote du sol

Le microbiote du terroir est probablement composé du microbiote du sol, des grains de blé semés, de l'air, du matériel agricole, des insectes, des adventices, ... Les pratiques agricoles pourrait être un facteur affectant le microbiote du levain, issue d'une agriculture biologique ou non (Bonanomi et al., 2016; Lhomme et al., 2014, 2015a; Pontonio et al., 2016) et donc impacter le microbiote de la farine. Des levures ont été retrouvées dans des sols variés : la levure *Kazachstania australis* a par exemple été retrouvée dans un sol d'Afrique du Sud (Jacques et al., 2016). L'abondance des levures serait plus importante dans les sols agricoles fertilisés (Vadkertiová et al., 2017). Plus précisément, les levures appartenant au phylum des Ascomycètes sont généralement plus fréquentes et plus abondantes dans les sols agricoles, les vergers et les prairies alors que les Basidiomycètes sont dominants dans les sols de forêts (Yurkov, 2018).

4.3.5.2. La graine : enveloppe externe ou interne

Pontonio et al. (2018) ont utilisé le cycle de vie de la plante *Origanum vulgare* L. pour étudier le microbiome endophyte et épiphyte (Pontonio et al., 2018). Ils ont retrouvé *L. plantarum* dominant dans les populations des LAB endophytes et épiphytes. Les approches de séquençage à haut-débit ont montré la plus grande diversité bactérienne dans les phases

végétatives et pleines fleurs, avec la floraison signant la différenciation microbienne principale. Une autre étude suggère que les LAB endophytiques du blé pourraient représenter un réservoir potentiel de souches robustes, pouvant dominer la flore bactérienne des levains (Minervini et al., 2018a). Ils ont en effet ensemencé des levains de laboratoire avec une souche de *Lactobacillus plantarum* endophytique du blé, qui est devenue prédominante après quelques rafraîchis. La transmission des bactéries pourrait alors se faire par la farine après l'écrasement du grain (De Vuyst et al., 2009).

4.3.5.3. La boulangerie : ustensile, eau, ingrédients supplémentaires

L'hypothèse que le microbiote de l'environnement du boulanger et de son fournil - le « house microbiota » littéralement le « microbiote du foyer » - joue un rôle important dans l'installation de la flore a été démontrée en Italie. Cela a été décrit pour le fromage (Gobbetti et al., 2018; Irlinger et al., 2015), comme dans des fromages artisanaux (Bokulich and Mills, 2013) et dans les fromages à pâte dure autrichiens (Quijada et al., 2018). C'est également le cas pour une liqueur fermentée chinoise où le microbiote environnemental a été une importante source de micro-organismes, et pourrait diriger la succession microbienne et le profil métabolique de la fermentation (Wang et al., 2018). Le microbiote du levain mature pourrait aussi provenir d'ingrédients supplémentaires que l'artisan choisirait de mettre : houblon, miel, fruits trop mûrs, grains de raisin, moût de raisin, sel, sucre, vinaigre dans l'idée d'inclure tout de suite dans la pâte des nutriments disponibles et micro-organismes fermentaires (Minervini et al., 2014). L'eau n'est actuellement pas considéré comme réservoir d'inoculum bactérien (Gobbetti et al., 2016). Cependant de futures études devraient être menées afin de s'assurer de cette hypothèse. De même, il conviendrait de vérifier si la qualité de l'eau impacte les cinétiques microbiennes et également la rhéologie et la durée de vie du pain

4.3.5.4. Les vecteurs biotiques de dispersion de microorganismes : le boulanger, les insectes, les oiseaux

Les insectes sont de probables sources de bactéries lactiques et de levures des levains. *Lactobacillus sanfranciscensis* a été retrouvé prédominant dans les échantillons fécaux des insectes *Tribolium castaneum* and *Trobilum confusum*. Les auteurs font l'hypothèse que les déjections des insectes sur les produits céréaliers, au stade plante ou graine, pourraient être le réservoir naturel de *L. sanfranciscensis* (Boiocchi et al., 2017a). Plusieurs espèces de levures détectées dans les levains ont été retrouvé dans les insectes. Par exemple, il a été retrouvé dans

le microbiote de la drosophile les espèces de levures *C. parapsilospsis*, *C. stellata*, *Kluveromyces marxianus*, *Lachancea kluveri*, *Pichia fermentans*, *P. membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Torulaspora delbrueckii* également retrouvées dans les levains (Stefanini, 2018). Les récents travaux de Gänzle et Zheng montrent que les levains de type I sont habités par des *Lactobacillus sanfranciscensis* adapté aux insectes (Gänzle and Zheng, 2018). D'autre part, des levures du genre *Candida spp.* ont été retrouvées dans le microbiote de l'oropharynx et le cloaque des Nandous d'Amérique, une espèce d'oiseaux d'Amérique du Sud (Brilhante et al., 2013) et des cloaques des oiseaux migrateurs en Sicile (Francesca et al., 2012).

4.3.6. Maintien du microbiote du levain

4.3.6.1. Dynamique au cours du temps

Le microbiote des levains est maintenu dans un équilibre dynamique par les boulangers. La stabilité d'un levain dépend de nombreux facteurs, incluant la composition microbienne de la farine, les interactions microbiennes, la composition biochimique de la farine en termes de carbohydrates et acides aminés libres, les activités enzymatiques de la farine, les paramètres technologiques spécifiques, l'environnement du boulanger, etc. (De Vuyst and Neysens, 2005; De Vuyst et al., 2017; Gänzle et al., 2007; Minervini et al., 2015a, 2015b; Viiard et al., 2013). Une étude de dynamique des levains (2016) a montré la stabilité relative de la communauté micorbienne des levains pendant le processus de panification (Lhomme, Urien et al., 2016). Toutefois les résultats de cette étude nécessitent d'être confirmé sur un plus grand échantillon. La stabilité de la composition microbienne des levains à long terme n'a pas été évalué.

4.3.6.2. Structuration spatiale des communautés microbiennes des levains

La structuration spatiale de la diversité des espèces des bactéries lactiques et de levures dans les levains n'a pas été étudié à ce jour en Europe (Gobbetti et al., 2016). Il a été retrouvé principalement en Belgique *S. cerevisiae* et *Wickerhamomyces anomalus*, en Italie *S. cerevisiae* et *K. humilis*. Ces différences pourraient être dues à la géographie mais aussi à des différences de pratique boulangère. L'équipe de Rob Dunn met une perspective mondiale à cette question, à travers un projet de science participative ou des citoyens et boulangers du monde entier ont fournis leur levain à analyser. Les résultats sont disponibles sur ce lien : http://robdunnlab.com/projects/sourdough/map/. Sur 567 levains étudiés, l'espèce de levure prédominante est *Saccharomyces cerevisiae* (408/567) ; et pour les bactéries *Lactobacillus*

brevis (111/567), *Lactobacillus* sp.7 (76/567), *Pediococcus sp*.1 (75/567), *Lactobacillus paralimentarius* (70/567) et *Lactobacillus plantarum* (49/567). Aucune structuration spatiale évidente n'est observée mais les résultats sont en cours d'analyse.

5. Le pain au levain

5.1. Les qualités organoleptiques des pains

Le pain au levain doit sa qualité organoleptique à son odeur, sa saveur et ses arômes (Gobbetti et al., 2014a). Ces caractéristiques sont liées à la perception des composés sapides et volatils formés au cours des étapes de la panification. Notamment lors de la fermentation avec la formation d'acides, d'alcools, d'esters et de kétones, lors de l'oxydation des lipides avec la formation d'aldéhydes et de kétones et lors de la réaction de Maillard avec la formation de pyrazines, pyridines, pyrroles, furanes, sulfures, aldéhydes et kétones (Figure 21). Outre son intérêt organoleptique, le levain améliore la valeur nutritionnelle du pain en facilitant l'utilisation de farines plus riches en fibres, en augmentant l'accessibilité aux minéraux et la préservation du pain (Katina et al., 2005).

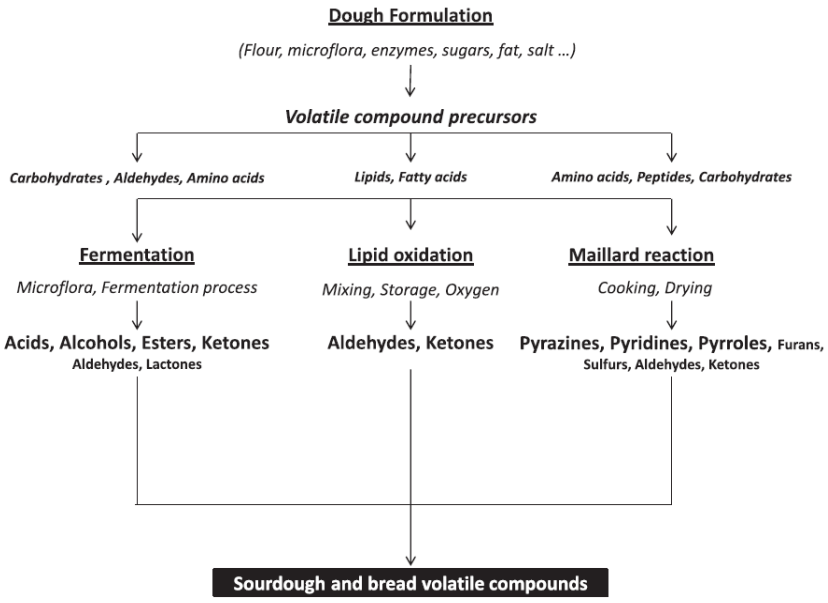


Fig. 2. Sourdough and sourdough-bread: major origins and main influential factors.

Figure 21. Levain et pain au levain : origines majeures des composés volatils et les facteurs principaux les influençant (Pétel et al., 2017)

Plus de 540 composés volatils du pain en général et du pain au levain ont été décrits dans la littérature (Pétel et al., 2017). Cependant, la contribution d'un composé à l'odeur et au

goût du pain dépend de sa concentration et du seuil de perception du consommateur et l'ensemble des composés présents. De plus, le taux de cendres des farines impacte la saveur du pain (Clément et al., 2018a; Katina et al., 2005).

5.2. La recette du pain et le diagramme de panification

Le pain au levain traditionnel est fabriqué à partir d'une pâte composée de farine, d'eau, de levain et de sel. Le levain est incorporé dans la pâte à pain à hauteur de 10 à 50% par rapport à la masse totale de la pâte. Ce pourcentage peut être variable selon les saisons et les pratiques des boulangers. Les ingrédients sont mélangés puis ce mélange est pétri mécaniquement ou manuellement. Le pétrissage permet l'hydratation des constituants de la pâte, l'application d'une force mécanique sur les protéines du gluten, la formation du réseau de gluten et l'incorporation d'air dans la pâte. La pâte pétrie est fermentée une première fois en anaérobiose lors du pointage. Le pointage permet le développement des arômes et la fermentation en masse de la pâte. Il dure de 1h à 5h. La pâte est ensuite divisée en pâtons puis façonnée. Les pâtons sont disposés dans une toile de lin pour la 2ème fermentation, l'apprêt. L'apprêt dure 1 à 2h et permet de donner volume au pâton. Les pâtons façonnés sont ensuite scarifiés et enfournés à 250 degrés. L'alcool produit lors de la fermentation est évaporé. La pâte subit en surface une caramélisation et une réaction de Maillard donnant les croûtes ses arômes caractéristiques (Roussel et al., 2002) (Figure 22).

5.3. Les qualités nutritionnelles et digestes du pain au levain

De nombreux articles parlent de gluten, de pain, d'intolérance… Les réactions physiologiques associées au gluten peuvent prendre différentes formes : hypersensibilité, allergie, maladie cœliaque. Il est possible de dépister une allergie ou une maladie cœliaque, mais à ce jour, il n'existe pas de test formel scientifique pour déterminer une hypersensibilité au gluten. Ceci limite énormément les recherches scientifiques pour répondre aux questionnements des consommateurs autour de ce sujet. Les « FODMAP » sont apparus il y a peu de temps. Les FODMAP rassemblent les oligosaccharides, les disaccharides, les monosaccharides fermentescibles et polyols, peu absorbés par l'intestin grêle. Ce sont des glucides fermentescibles à chaîne courte que l'on retrouve essentiellement dans les aliments d'origine végétale tels que le blé. Un régime FODMAP strict amène une consommation réduite de fibres alimentaires et ont préconisés pour les malades cœliaques (Loponen et al., 2018).

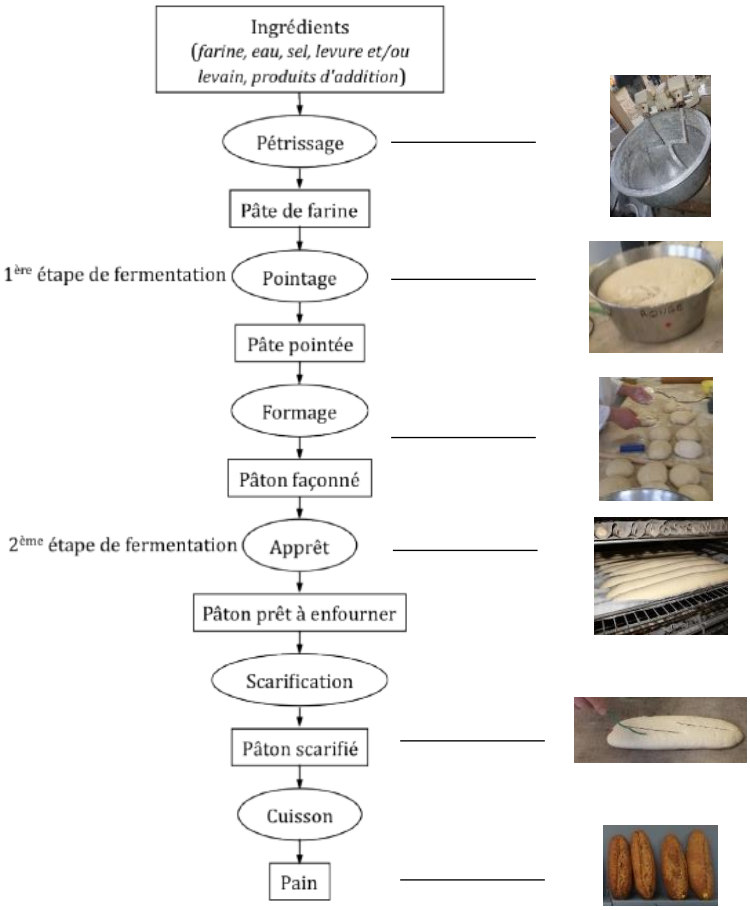


Figure 22. Diagramme de panification français. Photos projet BAKERY

III. Méthodes d'études en écologie microbienne des écosystèmes céréaliers

1. Les méthodes culture-dépendantes

1.1. Les milieux de culture

Depuis la découverte des micro-organismes et de leurs rôles par notamment Louis Pasteur, les microbiologistes ont développé et utilisé des milieux de culture pour les isoler, les compter et les identifier. Les milieux de culture varient en fonction des micro-organismes que l'on souhaite isoler, en matière de tolérance aux besoins nutritionnels, de résistance aux antibiotiques. Les milieux sélectifs peuvent avantageusement permettre l'enrichissement d'espèces rares, mais dans de nombreuses situations entraîner une perte de diversité avec les espèces ou souches qui ne poussent pas sur milieu -Formes Viables Non Cultivables. Ces méthodes dites de *microbiologie classique* sont encore utilisées très fréquemment, de routine dans les industries agro-alimentaires ou en microbiologie clinique, car elles conduisent notamment à l'obtention d'isolats.

1.2. Identification d'espèces à partir d'isolats

L'ADN de chaque isolat est utilisé pour l'identification de l'espèce. Avec des amorces spécifiques, une petite partie de l'ADN est amplifiée exponentiellement par une réaction en chaîne par polymérase (PCR). La PCR-DGGE, PCR couplée à une électrophorèse à gel dénaturant a été longtemps la technologie utilisée pour décrire la composition microbienne des levains (Cocolin et al., 2013). Cette technique permet de faire migrer l'ADN sur un gel dénaturant. La taille de l'amplifiat permet l'identification de l'espèce. D'autres méthodes existent, la RFLP, qPCR, des PCR spécialisées qui sont de moins en moins utilisées. De façon plus actuelle, la séquence ADN de cet amplifiat ou produit PCR est obtenue par séquençage de type Sanger. Cette séquence est ensuite comparée à des bases de données, permettant l'identification de l'espèce.

L'identification des espèces à partir d'isolats se fait le plus souvent à partir de marqueurs du génome qui sont amplifiés par PCR puis soit digérés par des enzymes de restriction (RFLP) soit séquencé. L'assignement à l'espèce se fait sur la base de la similarité avec des profils de restriction référent de chaque espèce ou des séquences présentes dans les bases de données. Le marqueur de l'ADN ribosomique bactérien 16S est le plus utilisé pour les bactéries. Il est ubiquitaire et est un bon marqueur évolutif. Sa taille est d'approximativement 1500 nucléotides, entrecoupée de régions hypervariables et d'autres très conservées (Weisburg et al., 1991). Le marqueur des levures les plus utilisés sont la région D1D2 de la large sous unité de l'ADNr ou les régions internes transcrites mais non traduites (ITS) de l'ADNr (Schoch et al., 2012). D'autres marqueurs peuvent être utilisés pour compléter une identification, en particulier des gènes impliqués dans des fonctions importantes de la cellule et donc conservés (*RPB1*, *RPB2*, *EF-1α* pour les levures ; *katA*, *recA*, *pheS* pour les bactéries). Dans les levains, les espèces *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* et *Lactobacillus pentosus* sont très proches génétiquement. Le marqueur 16S ne permet de pas de les distinguer, le gène *recA* est alors utilisé pour les distinguer (Torriani et al., 2001). De même les espèces K. *saulgeensis* et K. *serrabonitensis* d'une part et K. *exigua* et K. *australis* d'autres part sont très proches sur la base de *D1/D2* et *ITS* et des marqueurs comme *RPB2* et EF-1α permettent de les distinguer (Jacques et al., 2016).

1.3. Caractérisation biochimique des espèces

Le métabolisme des espèces est étudié en anaérobie et/ou en anaérobie analysant les activités enzymatiques, la consommation et productions des sucres, des lipides et des acides

aminés. Ces analyses ne permettent pas une identification taxonomique car il existe de la diversité métabolique intraspécifique mais donne un profil biochimique pour chaque souche. Des systèmes biochimiques tels que les galeries API (Biomérieux, France) ou le système Biolog permettent facilement d'étudier la consommation de métabolites.

2. L'avènement des omics

Les *omics* désignent l'ensemble des nouvelles technologies, génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique, etc. Ils permettent l'exploration de nouveaux génomes et gènes, des descriptions de fonctions spécifiques, de comparaison d'écosystèmes, de reconstruction de génomes, etc. Ils permettent une approche taxonomique pour répondre à la question « qui est là ? » et une approche fonctionnelle en terme d'interaction, d'abondance, de fonction dans l'écosystème pour répondre à la question « Qui est capable de faire quoi ? ». Elles permettent d'étudier les variations du génome, de son expression en fonction de facteurs environnementaux. Les *omics* passent par un échantillonnage qui doit représenter la population étudiée et une extraction d'ADN, ARN, protéines, métabolites se faisant sur la matrice complète. Qu'en est-il des *omics* sur les levains ? Une équipe a proposé récemment une review sur le sujet autour des levains (Weckx et al., 2018). Un ensemble des -omes et -omics a été mis en ligne par le CHI, Institut de Cambridge (http://www.genomicglossaries.com/content/omes.asp). Quand on parle de microorganismes, les chercheurs utilisent maintenant les termes de microbiome, de microbiote et de métagénome. Le microbiome est l'habitat entier d'un environnement donné, incluant les micro-organismes, leurs génomes et conditions environnementales regroupant les facteurs biotiques et abiotiques. Le microbiote est l'assemblage des micro-organismes présent dans un environnement défini. Le métagénome est la collection des génomes et des gènes des membres d'un microbiote.

2.1. La métagénétique

La métagénétique ou métabarcoding cible une séquence marqueur « code-barres » spécifique de l'ADN. Comme cité précédemment, les marqueurs les plus utilisés sont l'ADN ribosomique 16S pour les bactéries et l'ITS ou une région de la LSU pour les micro-eucaryotes. Elle permet une description de la diversité des espèces. L'ADN extrait doit être de bonne qualité et en concentration suffisante. Le séquençage « 454 » a été utilisé dans plusieurs papiers sur les levains (Ercolini, 2013; Lhomme et al., 2015a), cependant les développeurs de la technologie ont arrêté son utilisation depuis 2016. La technologie MiSeq (Illumina) est une technique très utilisée à l'heure actuelle et a été utilisée à plusieurs reprises dans les levains (Coda et al., 2017;

Michel et al., 2016; Minervini et al., 2018b; Raimondi et al., 2017). Après séquençage, les séquences d'ADN sont regroupées en OTU (unité taxonomique opérationnelle) avec plus de 98% de similarités. Ces OTU sont identifiées par comparaison avec des bases de données dont SILVA (Pruesse et al., 2007) et UNITE (Kõljalg et al., 2005). L'abondance relative de chaque OTU donne une image de l'écosystème étudié.

Ces technologies révèlent, en plus des espèces dominantes retrouvées en microbiologie culture-dépendante, d'autres espèces minoritaires, comme des *Enterobacteriaceae* (Bessmeltseva et al., 2014; Ercolini, 2013), des *Acetobacter* dans des pains chinois fait à partir d'un starter de Jiaozi (Li et al., 2017; Liu et al., 2018). Malgré de multiples biais, lors de l'extraction de l'ADN, de la construction de la librairie de séquençage et l'amplification de l'ADN de cellules mortes, de la profondeur de séquençage, cette technique semi-quantitative donne une image plus précise de la diversité spécifique du microbiote que les méthodes culture-dépendantes. Cette technique a été utilisée pour analyser plusieurs produits fermentés tel un produit fermenté typique de la province du Hainan (sud de la Chine) ayant fait du MiSeq (ADNr 16S V3-V4) (Zhang et al., 2016). Les analyses de métabarcoding de champignon des produits fermentés ont ciblé essentiellement les produits laitiers et les boissons alcoolisées (Filippis et al., 2017). Les analyses de communautés fongiques des produits végétaux fermentés ne sont pas très nombreuses, mais incluent la fève de cacao (Illeghems et al., 2012), l'olive verte (Arroyo-López et al., 2016), le douchi , le thé pu-erh (Zhang et al., 2016), le kombucha (Coton et al., 2017; Reva et al., 2015), le paocai (Liang et al., 2018) et les levains de panification (De Vuyst et al., 2016; Minervini et al., 2012, 2015b).

2.2. L'étude des génomes microbiens

La génomique est l'étude de génomes complets, fondé sur la détermination de la séquence nucléotidique de l'ADN d'une souche. Il implique également une annotation des gènes prédits pour au moins une souche de chaque espèce. Parmi les espèces de levures trouvées dans les levains, les génomes des espèces du genre *Saccharomyces* ont tous été séquencés, en particulier celui de l'espèce de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*. Le seul génome de *Kazachstania* de levain qui a été séquencé en haute qualité est le génome de *Kazachstania saulgeensis* CLIB 1764^T (Jacques et al., 2016; Sarilar et al., 2017) avec le numéro d'accession PRJEB20516 (NCBI). Cette souche a été isolée chez Michel Perrin, un paysan-boulanger du projet BAKERY (Jacques et al. 2016, Urien et al. soumis). La taille du génome de cette souche est de 12.9 Mpb et contient 5326 gènes putatifs codant pour des protéines, sans les pseudogènes

et transposons. Les génomes de *Pichia kudriavzevii* CBS5147 (10,5 Mb), *Wickerhamomyces anomalus* CBS5759 (14,1 Mb), *Meyerozyma guilliermondii* CBS2030 (10,6 Mb), *Torulaspora delbrueckii* CBS1146 (9,2 Mb) ont également été séquencés. Le nombre de scaffolds reste élevé pour *Pichia kudriavzevii* CBS5147 (10,5 Mb), *Wickerhamomyces anomalus* CBS5759 (14,1 Mb), avec 62 et 46 scaffolds respectivement. Il est de 9 et 8 pour *Meyerozyma guilliermondii* CBS2030 (10,6 Mb) et *Torulaspora delbrueckii* CBS1146 (9,2 Mb) respectivement.

Concernant les bactéries lactiques, 47 génomes ont été recensés par Weckx et al (Dertli et al., 2018; Weckx et al., 2018). On retrouve, notamment dans les levains, les espèces *Lactobacillus acidifarinae*, *L. crustorum*, *L. frumenti*, *L. hammesii*, *L. mindensis*, *L. namurensis*, *L. nantensis*, *L. pontis, L. rossiae*, *L. sanfranciscensis*, *L. secaliphilus*, *L. siliginis*, *L. spicheri*, *L. zymae* (Sun et al., 2015), *L. panis* (Sun et al., 2015; Zhu et al., 2015), *L. brevis*, *L. fermentum* (Verce et al., 2018), *L. paraplantarum*, *L. plantarum* (Ladero et al., 2013; Martino et al., 2016), *L.reuteri* (Lin and Gänzle, 2014; Torres et al., 2016), *L. sanfranciscensis* (Vogel et al., 2011), *L. zymae* (Kazou et al., 2017), *L. lactis subsp. lactis* (Guellerin et al., 2016), *Leuconostoc citreum* (Laguerre et al., 2012), *Weissella cibaria* (Lynch et al., 2015) et *Weissella confusa* (Amari et al., 2012).

2.3. La métagénomique

La métagénomique ou séquençage shot gun permet d'élucidation de la composition taxonomique mais aussi de décrire le potentiel fonctionnel d'un gène dans un échantillon. Cela reste une méthode plus chère et plus difficile que la métagénétique. Il n'y a actuellement pas de publications d'étude métagénomique de levains.

2.4. L'étude du monde des ARN : la transcriptomique et la métatranscriptomique

Le transcriptome de la souche de bactérie lactique, *L. lactis subsp. lactis* A12 a été étudié en 2013. Les auteurs ont décrit des régions génomiques permettant une plus grande variation de métabolisme, en comparaison avec une souche IL1403 trouvée sur les plantes. Cette variation a été confirmée par son phénotype en milieu de culture (Passerini et al., 2013). Une autre étude a analysé la réponse transcriptionnelle de *Lactobacillus reuteri* ATCC55730 pendant la fermentation du levain. Un levain synthétique a notamment été utilisé reproduisant le milieu levain avec des sucres, du citrate de calcium, de l'acide folique, de la riboflavine, etc. (Elli et al., 2000) et également des puces à ADN de génome complet (Hüfner et al., 2008). Ces

deux études montrent qu'il existe des patterns de gènes favorisant l'adaptation à l'écosystème levain. Ce sont des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et des carbohydrates, de biosynthèse de coenzyme et de réponse au stress.

La métatranscriptomique repose sur la quantification des ARN messagers, permettant d'avoir une indication relative du taux de transcription de différents gènes dans un écosystème. Afin de comprendre la dynamique fonctionnelle des levains, des études avec des puces à ARN ont été menées au cours de quatre fermentations spontanées de levains de 10 jours (Weckx et al., 2011). En raison de l'instabilité de l'ARN, l'extraction doit se faire dans les meilleures conditions et l'ARN doit être analysé rapidement ce qui peut être contraignant pour des ferments qui ont des dynamiques rapides. L'étude a révélé l'activation de différentes voies métaboliques clés, la capacité à utiliser les carbohydrates autres que le glucose (amidon et maltose), la conversion des acides aminés comme une contribution à l'équilibre redox et la génération de composés liés à la flaveur du levain.

2.5. La métaprotéomique

La protéomique permet de décrire les protéines dans un échantillon et la métaprotéomique dans un écosystème. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées : 1) la séparation des protéines sur gel d'électrophorèse d'acrylamide en deux dimensions puis l'identification par spectrométrie de masse, 2) le système MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionisation-time-offlight mass spectrometry) (Ortea et al., 2016). De Angelis et al. (2016) a proposé une revue détaillant les études de protéomiques sur les souches du genre *Lactobacillus* et les méthodes d'identification (De Angelis et al., 2016). Des études décrivent également la protéomique des levures (Lian et al., 2018). Aucune étude de métaprotéomique sur les levains n'a été décrite à ce jour.

2.6. La description des flux métaboliques : La métabolomique

La métabolomique permet l'analyse fonctionnelle des réseaux métaboliques, par l'identification du réseau fonctionnel, la mesure de la réponse à des perturbations (génétiques, environnementales), le comportement dynamique, les principes généraux d'organisation, de fonctionnement, de régulation, la relation structure/fonction/régulation. La métabolomique nécessite une plateforme d'analyse des métabolites, des spectrométries vibrationnelles, spectrométrie de masse, etc. Un article sur les levains a été récemment publié, où les auteurs

ont comparé le pain de levain de seigle et levain de blé en LC-QTOF-MS (liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry). Ils ont identifié 118 composés dans le levain de blé ou de seigle , incluant des acides aminés en chaîne ramifiée leucine et isoleucine, de métabolites d'acide aminés à chaîne ramifiée, des métabolites microbiens d'acides phénoliques et d'autres composés potentiellement bioactifs (Koistinen et al., 2018).

2.7. Intérêts et limites des *omics*

Cette nouvelle génération des méta-*omics* permet d'appréhender des approches taxonomiques et fonctionnelles. Les approches taxonomiques permettent d'estimer la diversité de genres, d'espèces, de souches et de leur assemblage au sein d'un écosystème. C'est par exemple le cas du métabarcoding qui permet d'avoir une vision de la diversité des espèces, rapidement et de façon peu coûteuse. Les approches fonctionnelles (méta-transcriptomique, méta-protéomique, méta-métabolomique, etc.) permettent aussi d'estimer la diversité fonctionnelle de l'écosystème. Elle repose sur la génomique fonctionnelle, qui permet de décrire la fonction des gènes, leurs expressions, leurs régulations et interactions entre gènes par des approches globales indirectes (transcriptomique, protéomique) et directes (métabolomique, fluxomique). Il est intéressant de mettre toutes ces approches en lien pour avoir une vision claire de l'écosystème étudié (Table 4) mais les liens entre chaque niveau méta-génome, méta-transcriptome et méta-métabolome ne sont pas triviaux à analyser.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons utilisé les méthodes de microbiologie classique et de métabarcoding pour étudier la diversité des espèces des levains français (chapitre III) et comprendre quels étaient leur origine et leur impact sur la qualité du pain (chapitre IV).

	Méthodes culture-indépendantes								
	Métabarcoding	Génomique	Métagénomique	Transcriptomique	Méta-transcriptomique	Protéomique	Metaprotéomique	Métabolomique	Méta-métabolomique
Définition	cible une séquence marqueur « code-barres » spécifique de l'ADN d'un microbiote, construction d'une librairie, séquençage à haut-débit de type MiSeq	la détermination de la séquence nucléotidique de l'ADN d'une souche, annotation des gènes prédits	Méthode dite shot-gun, tous les gènes et génomes d'un échantillon sont séquencés	Description de l'expression des gènes basée sur l'ARN		Décrit les protéines d'une souche ou d'un écosystème, étudie leurs interactions, structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines		Etude des métabolites primaires (sucres, acides aminés, acides gras…) et métabolites secondaires, analyse fonctionnelle des réseaux métaboliques	
Matrices	Amplification de la région 16S (V1-V4, V1-V3, V3-V4), Amplification de la région ITS1 ou ITS2	Génome complet	Ensemble des génomes de l'échantillon	Ensemble des ARN messagers de la souche ou de l'écosystème		Ensemble des protéines de la souche ou de l'écosystème		Ensemble des métabolites de la souche ou de l'écosystème	
Avantages	vision globale des espèces présentes, du microbiote, prix abordable, analyses bio-informatiques développées, diversité intraspécifique	étude de tout le génome, nombre de gènes et annotation fonctionnelle	Elucidation composition taxonomique mais aussi potentiel fonctionnel. Pratique pour les écosystèmes de faible complexité	Indication relative du taux de transcription de différents gènes dans un écosystème		Indication du taux de traduction des gènes après les régulations post-transcriptionnelles Vision globale des protéines produites dans l'écosystème		Approche très puissante qui permet de s'affranchir des « problèmes » de régulations post-transcriptionnelles et traductionnelles	
Contraintes	Biais lié à l'extraction d'ADN, cellules mortes et vivantes, compétence en bio-informatique	Besoin d'un génome de référence pour annoter	Cher, analyses bio-informatiques importantes	Instabilité des ARNm, pas d'informations sur la régulation post-transcriptionnelle		Bases de données non complètes, extraction des protéines		Etude coûteuse	
Dans les levains	utilisée fréquemment	47 génomes de LAB + 1 génome de levures	Pas d'articles	1 article	3 articles (puces à ARN)	1 article	Pas d'articles	1 article	Pas d'articles

Table 4. Récapitulatif des grandes méthodes *omics*, définition, matrices utilisées, avantages, contraintes et situation dans l'étude des levains

Chapitre II. Présentation générale des Matériels et Méthodes mis en en œuvre pendant la thèse

Ce chapitre résume les expériences de recherche participative mises en place dans la thèse, les méthodes d'analyse microbiologiques des graines, farines, levains qui seront détaillées dans les chapitres III et IV. Il présente les méthodes du développement d'une méthode de métabarcoding en collaboration avec le projet METABAR-FOOD de l'INRA, qui fera l'objet d'un article. Il résume les méthodes d'analyses des farines, des pâtes et des pains qui feront parties d'un article en collaboration avec l'UMR IATE et un article avec Philippe Roussel (Figure 23). L'objectif de ce chapitre est aussi qu'il soit compris par des non-experts, les détails sont indiqués dans les articles en anglais.

Expériences de recherche participative	Collecte de 40 levains et pratiques boulangères Diagrammes de panification Expérience du semis aux pains	Chapitres III, IV, V
Caractérisation microbiologiques des graines, farines, levains	Métabarcoding Méthodes culturales	Chapitres III, IV, V Article du projet METABAR-FOOD à venir
Caractérisation des farines	Granulométrie Activité enzymatique Analyses protéines en SE-HPLC Taux de cendres Analyse capacité d'absorption	Article en collaboration avec Philippe Roussel (Triptolème) à venir Article en collaboration avec l'UMR IATE à venir
Caractérisation des pâtes	Observations visuelles et tactiles Suivi de la fermentation	Chapitres IV et V Article en collaboration avec Philippe Roussel (Triptolème) à venir
Caractérisation des pains	Observations des pains Analyses physicochimiques Analyses sensorielles	Chapitres III et IV

Figure 23. Schéma résumant matériels et méthodes mis en en œuvre pendant la thèse

1. Echange de savoirs autour des pratiques boulangères et de levains entre boulangers et scientifiques

L'étude a rassemblé 40 boulangers, dont 22 boulangers et 18 paysans-boulangers. 35 d'entre eux travaillent en agriculture biologique, 5 en agriculture non biologique. Les boulangers sont répartis sur la métropole française (Figure 24), certains sont rattachés à des associations comme le Réseau Semences Paysannes, Triptolème. La liste des boulangers est disponible en

Annexes 1. La collecte des savoirs sur les pratiques boulangères s'est faite par une enquête en ligne (http://sondage.univ-brest.fr/limesurvey/index.php/636657/lang-fr), lors de deux rencontres au fournil, lors de réunions BAKERY, au cours d'entretien individuel chez le boulangers et au téléphone.



Figure 24. Localisation géographique des boulangers BAKERY

2. Processus de panification type

Les diagrammes de panification sont très variables d'un boulanger à l'autre. Nous indiquerons dans la description ci-dessous les données du chapitre 3 obtenues sur les pratiques de 35 boulangers et paysans-boulangers français, en indiquant la gamme de variation et la médiane de certaines variables clés. Le pain au levain traditionnel est fabriqué à partir d'une pâte composée de farine, d'eau, de levain et de sel. Le levain est incorporé dans la pâte à pain à hauteur de 2 à 33% (médiane=14%) par rapport à la masse totale de la pâte (données BAKERY). Ce pourcentage peut être variable selon les saisons et les pratiques des boulangers. Les ingrédients sont mélangés dans un pétrin mécanique ou manuellement. Le pétrissage permet l'hydratation des constituants de la pâte, la formation du réseau de gluten, l'application d'une force mécanique sur les protéines du gluten, et l'incorporation d'air dans la pâte. La pâte pétrie est fermentée une première fois lors du pointage. Le pointage permet le développement

des arômes et la fermentation en masse de la pâte. Il dure de 0h à 22h (médiane=3h) (données BAKERY). La pâte est ensuite divisée en pâtons puis façonnée. Les pâtons sont disposés dans une toile de lin pour la 2ème fermentation, l'apprêt. L'apprêt dure 1 à 14h (médiane 2h) et permet de donner du volume au pâton. Les pâtons façonnés sont ensuite scarifiés (on parle de guigne) et enfournés à des températures de 230-280 degrés. L'alcool produit lors de la fermentation est évaporé. La pâte subit en surface une caramélisation et la réaction de Maillard donne à la croûte ses arômes caractéristiques (Roussel et al., 2002) (Figure 22).

3. Echantillons biologiques

3.1. Collecte des levains de 38 boulangers, paysans-boulangers français

Les levains ont été collectés avec un kit de collecte (Annexes 2) et les boulangers ont signé un MTA (Accord de Transfert de Matériel) qui a été construit collectivement entre boulangers, paysans-boulangers, associations (RSP, Triptolème), scientifiques et un juriste INRA (Annexes 3, Annexes 4). Les levains ont été soit récupérés directement sur place ou envoyés par un transporteur en 48h. Les levains étaient étalés sur boite de Pétri dans les 48h après l'arrivée au laboratoire. La carte de France ci-dessus présente la situation géographique des boulangers.

3.2. Construction d'une expérimentation collective et collecte des échantillons le long de la filière boulangerie à faible intrant

Un dispositif expérimental a été mis en place en lien avec un projet interrégional breton et des Pays de la Loire (SAFARI) par l'équipe de Véronique Chable (INRA Rennes- SAD Paysage). Trois populations de blés anciens (Bladette de Provence, Redon Roux Pâle, Saint Priest le Vernois Rouge) et trois variétés de blés commerciales (Renan, Chevalier, Pirénéo) ont été cultivées sur quatre terroirs différents, avec des semis en conditions de production au semoir de 3 m et des modalités randomisées entre les fermes (Table 5). Les terroirs appartiennent aux agriculteurs Florent Mercier (variétés populations), Gilles Simonneaux (variétés populations et commerciales), le Lycée agricole du Rheu (variétés populations et commerciales) et Laurent Marteau (variétés commerciales). Pour des questions de quantité de grains, nous avons mélangé les variétés modernes d'une part et les populations anciennes d'autre part pour faire deux lots « modernes » et « anciens ».

Variétés	Type de blé	Origine	Aristation	Teneur en protéines	Inscription
Renan	Commercial	France	Barbu	Moyenne	1990
Pireneo	Commercial	Autriche	Barbu	Assez élevée	2004
Chevalier	Commercial	Autriche	Non barbu	Assez faible	2006
Saint Priest et le Vernois Rouge	Population	Allier (03)	Non barbu	Moyenne	-
Redon Roux Pâle	Population	Pays de Redon (35)	Non barbu	Moyenne	-
Bladette de Provence	Population	Provence	Non barbu	Elevée	-

Table 5. Caractéristiques des variétés de blés cultivés par les agriculteurs
Source: Avalis and "des blés bio…diversité", document technique, 2011

Ce dispositif nous a permis d'obtenir 6 lots de grains (un mélange de variétés populations x 3 terroirs et un mélange de variétés commerciales x 3 terroirs). Les farines T80 des six lots de graines obtenues sur moulin Astrié sur la ferme d'Orvilliers, ont été envoyées à quatre boulangers : Michel Perrin, Pain Virgule, Hélène Simon, Lili Moyses, qui ont initié et maintenu six levains pendant trois semaines. Le protocole était propre à chaque boulanger, mais identique pour les 6 farines. Ce protocole a été noté sur une feuille de suivi des levains. Des échantillons de levains ont été prélevés à intervalles réguliers pour les analyses microbiologiques et physicochimiques. En parallèle, des levains ont été produits au laboratoire avec le même protocole. Les levains ont été rapatriés à l'INRA de Nantes pour une panification avec un diagramme fixe avec l'aide de Philippe Roussel (Table 6). Le dispositif complet est présenté sur la Figure 25.

TEMPERATURES	Eau 30 °C, Levain 6°C, Farine 20 °C, Fournil 20 °C
PETRISSAGE	
Vitesse lente	4 min, 100 rpm
Autolyse	10 min
Vitesse rapide	2 min, 200 rpm
POINTAGE	
Fermentation en cuve	120 min
Division	10 min (pâtons de 500g)
Boulage	20min
Détente	20 min
FACONNAGE	15, manuel
APPRET	140 min
CUISSON	30 min, 245°C

Table 6. Diagramme de panification



Figure 25. Construction d'une expérimentation collective

4. Caractérisation microbiologique des graines, farines et levains

4.1. Extractions d'ADN de graines, farines, levains

L'analyse par métabarcoding consiste à extraire directement l'ADN d'une matrice d'intérêt, puis amplifier et séquencer un code barre dont la diversité reflète celle des espèces présentes dans la matrice. L'extraction d'ADN de ces trois matrices a été réalisée avec le kit Powersoil (Qiagen, USA). Le principe de l'extraction est le suivant. Elle se fait en plusieurs étapes : une première étape de lyse physique, chimique et thermique des cellules, une deuxième grande étape de lavage (enlever les membranes, le cytoplasme…), une troisième étape de purification par filtration sur une colonne afin d'enlever les ARN et les protéines associées à l'ADN) et une dernière étape d'élution dans un tube. La flore microbienne associée aux graines est analysée après macération en suivant les protocoles établis par l'ISTA (International Seed Testing Association). Les graines sont mises à tremper dans une solution saline pendant une période de 20 à 48h. Le macérât est récupéré puis utilisé pour l'extraction de l'ADN. C'est donc la flore de surface des grains qui est analysée. Les farines sont homogénéisées avec une solution saline avec un Stomacher (Biomérieux, France) puis centrifugée. Le filtrât est utilisé pour l'extraction d'ADN. L'extraction totale d'ADN a été faite sur le filtrat de farine ou sur 200 mg de levain.

4.2. Extraction d'ADN de communautés microbiennes synthétiques (mocks)

Dans le cadre d'un projet de standardisation des méthodes de métabarcoding pour les aliments fermentés (METABAR-Food), des communautés synthétiques ont été réalisées

(=mocks). Deux types de mock ont été réalisés en triplicat : 1) des « mocks ADN » où l'ADN de chaque espèce déjà rencontrée dans les levains de panification (au total 32 espèces) a été ajouté dans chaque mock en équimolarité et pour une concentration finale du mock à 10 ng/µL, des « mocks PCR », où on a mélangé en équimolarité des amplifiats de chaque barcode, amplifiat réalisé séparément sur l'ADN de chaque souche représentant les espèces de levain.

4.3. Amplification d'un marqueur par PCR et séquençage

Les marqueurs *ITS1* pour les champignons et ADNr 16S V3-V4 pour les bactéries ont été utilisé pour étudier le microbiote des graines, farines et levains. Dans le développement d'une méthode de barcoding pour les micro-eucaryotes, les mocks « ADN » ont été amplifiés avec quatre marqueurs *ITS1*, *ITS2*, *D1D2* (LSU) et *RPB2* afin de comparer leur capacité à discriminer les espèces dans les communautés. Pour les « mocks PCR », chaque ADN d'espèce a été amplifié pour les marqueurs *ITS1*, *ITS2*, *D1D2* (LSU) et *RPB2*. Les produits PCR issus de cette réaction ont été mélangés pour construire les mocks. Les mocks PCR1 ont été construits avec 30 ng/µL de chaque échantillon. Les mocks ont été faits en triplicat indépendants. Les échantillons ont été séquencés par un séquençage à haut-débit, avec la technologie MiSeq Illumina *i)* sur la plateforme Génotoul à Toulouse pour les échantillons MOCKS ; *ii)* en collaboration avec Matthieu Barret, IHRS, équipe Emersys de l'INRA d'Angers pour l'analyse des bactéries et des levures dans les levains français (chapitre III - partie I et II) ; *iii)* en collaboration avec Sylvain Santoni, UMR AGAP, INRA Montpellier, pour l'analyse des levures et bactéries des graines, farines, levains (chapitre IV).

4.4. Construction d'une base de données de séquence de barcode pour les levures

Dans le cadre du développement d'une méthode standard d'analyse des micro-eucaryotes dans les communautés microbiennes des produits fermentés il était nécessaire de compléter les bases de données avec les séquences des barcodes de toutes les espèces trouvées dans les produits fermentés. Nous avons choisi de nous concentrer sur 4 groupes de produits fermentés : levain de panification, moût de raisin, fromage, produits animaux, et d'ajouter la drosophile pris comme vecteur dispersant potentiellement les levures. Je me suis occupée des espèces trouvées dans le levain de panification, le vin et la drosophile. Les souches types des espèces répertoriées dans la bibliographie ont été collectées de la collection française du CIRM (https://www6.inra.fr/cirm/Levures) ou dans certains cas d'autres collections de levures (CBS,

MUCL). Les Table 7,Table 8 et Table 9 indiquent pour chaque espèce sa taxonomie (phylum, classe, ordre, famille, genre) et son numéro d'accession CBS de l'institut Westerdijk. Les ADN des isolats ont été extraits avec le kit MasterPure Yeast DNA (Epicentre, Illumina, USA). La qualité et la quantité d'ADN a été vérifié avec un fluoromètre Qubit (Invitrogen, USA). Tous les ADN ont été amplifiés par PCR pour la région *ITS*, le domaine D1/D2 du gène ADNr 26S pour la grande sous-unité de l'ARN polymérase II *RPB2*. Les amorces utilisées ont été respectivement ITS1F et ITS4 (White et al., 1990), NL1 et NL4 (O'DONNELL, 1993), RPB2-5F et RPB2-7cR (Liu et al., 2016). Les amorces sont indiquées dans le tableau Table 10. Les produits PCR ont été séquencés avec un séquençage Sanger. L'affiliation des séquences ont été vérifiées avec des alignements sur NCBI Blast et sur la base de données YeastIP. Les bases de données pour chaque marqueur ont été construites avec les séquences obtenues (Weiss et al., 2013).

4.5. Les analyses bio-informatiques

Les analyses bio- informatiques ont été faites par nos collaborateurs de l'INRA de Jouy-en-Josas et de Toulouse pour le développement de méthode et les échantillons du chapitre III. Avec l'aide d'Olivier Rué (INRA Jouy-en-Josas), j'ai fait tourner les pipelines d'analyses bio-informatiques, en lignes de commande sous Migale (http://migale.jouy.inra.fr). Le pipeline d'analyse (Figure 26) comprend différents outils de FROGS « Find Rapidly OUT with Galaxy Solution » (Escudie et al., 2015), Flash qui permet de merger les séquences (Magoč and Salzberg, 2011), Cutadapt pour enlever les adaptateurs de la librairie de séquençage (Martin, 2011), nettoyage des données avec Sickle (Core, 2015), un contrôle qualité des séquences avec un script de FastQ. Les séquences ont été regroupées en cluster avec Swarm (Mahé et al., 2014) et les chimères détectées avec Vsearch (Rognes et al., 2016). Les séquences ont été filtrées sur leur abondance puis filtrés dans le cas des ITS avec ITSx. ITSx permet de valider que les OTUs sont bien des ITS et permet de supprimer les parties autres que l'ITS1 (Bengtsson-Palme et al., 2013). L'affiliation taxonomique des séquences s'est faite pour les levures (ITS) avec les bases de données UNITE (Kõljalg et al., 2005), 2005), YeastIP (Weiss et al., 2013) et notre base de données et pour les bactéries (16S) avec Silva (Pruesse et al., 2007).

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	CBS
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Hyphopichia*	*Hyphopichia pseudoburtonii*	
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Lodderomyces*	*Candida parapsilosis*	CBS604
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Lodderomyces*	*Candida tropicalis*	CBS94
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Lodderomyces*	*Lodderomyces elongisporus*	CBS2605
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Meyerozyma*	*Candida carpophila*	CBS5256
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Meyerozyma*	*Meyerozyma guilliermondii*	CBS2030
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Millerozyma*	*Millerozyma farinosa*	CBS185
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Phaffomycetaceae*	*Wickerhamomyces*	*Wickerhamomyces anomalus*	CBS5759
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Pichiaceae*	*Pichia*	*Pichia fermentans*	CBS187
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Pichiaceae*	*Pichia*	*Pichia kudriavzevii*	CBS5147
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Pichiaceae*	*Pichia*	*Pichia membranifaciens*	CBS107
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Pichiaceae*	*Pichia*	*Pichia norvegensis*	CBS6564
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Pichiaceae*	*Pichia*	*Pichia occidentalis*	CBS5459
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Kazachstania*	*Kazachstania barnettii*	CBS5648
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Kazachstania*	*Kazachstania bozae*	B24_15_CLIB1989
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Kazachstania*	*Kazachstania bulderi*	CBS8638
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Kazachstania*	*Kazachstania exigua*	CBS379
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Kazachstania*	*Kazachstania humilis*	CBS5658
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Kazachstania*	*Kazachstania saulgeensis*	Species newly described
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Kazachstania*	*Kazachstania servazzii*	CBS4311
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Kazachstania*	*Kazachstania sp.*	B24-3_CLIB1990
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Kazachstania*	*Kazachstania unispora*	CBS398
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Kluyveromyces*	*Kluyveromyces marxianus*	CBS712
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Lachancea*	*Lachancea kluyveri*	CBS3082
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Nakaseomyces*	*Candida glabràa*	CBS138
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Saccharomyces*	*Saccharomyces bayanus*	CBS380
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Saccharomyces*	*Saccharomyces cerevisiae*	CBS1171
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Saccharomyces*	*Saccharomyces pastorianus*	CBS1538
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Saccharomyces*	*Saccharomyces uvarum*	CBS395
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Starmerella*	*Candida stellàa*	CBS157
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Torulaspora*	*Torulaspora delbrueckii*	CBS1146
Basidiomycota	*Microbotryomycetes*	*Sporidiobolales*	*Sporidiobolaceae*	*Rhodotorula*	*Rhodotorula mucilaginosa*	CBS17

Table 7. Espèces trouvées dans les levains et utilisées dans les communautés synthétiques (mocks) du pain.

Pour chaque espèce est indiquée sa taxonomie, e.g. phylum, classe, ordre, famille, genre et son numéro d'accession CBS de l'Institut Westerdijk.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Synonym species	CBS
Ascomycota	*Dothideomycetes*	*Dothideomycetidae*	*Saccotheciaceae*	*Aureobasidium*	*Aureobasidium pullulans*		NONtype
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Candida*	*Candida metapsilosis*		CBS10907
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Debaryomyces*	*Debaryomyces hansenii*		CBS767
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Hyphopichia*	*Hyphopichia burtonii*		CBS2352
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Kurtzmaniella*	*Candida zeylanoides*	*[Candida] zeylanoides*	CBS619
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Meyerozyma*	*Meyerozyma caribbica*		CBS9966
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Schwanniomyces*	*Schwanniomyces etchellsii*		CBS2011
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Metschnikowiaceae*	*Clavispora*	*Candida intermedia*	*[Candida] intermedia*	CBS572
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Metschnikowiaceae*	*Clavispora*	*Clavispora lusitaniae*		CBS6936
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Metschnikowiaceae*	*Metschnikowia*	*Metschnikowia pulcherrima*		CBS5833
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Metschnikowiaceae*	*Metschnikowia*	*Metschnikowia reukaufii*		CBS5834
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Pichiaceae*	*Brettanomyces*	*Brettanomyces bruxellensis*		CBS74
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Pichiaceae*	*Kregervanrija*	*Kregervanrija fluxuum*	*Candida vini*	CBS639
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Pichiaceae*	*Pichia*	*Pichia kluyveri*		CBS188
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Pichiaceae*	*Pichia*	*Pichia terricola*		CBS2617
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Citeromyces*	*Citeromyces màritensis*		CBS2764
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Lachancea*	*Lachancea thermotolerans*		CBS6340
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Zygotorulaspora*	*Zygotorulaspora florentina*		CBS746
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetales incertae sedis*	*Candida*	*Candida sake*		CBS159
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetales incertae sedis*	*Diutina*	*Diutina rugosa*	*Candida rugosa*	CBS613
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetales incertae sedis*	*Starmerella*	*Candida apicola*	*[Candida] apicola*	CBS2868
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetales incertae sedis*	*Starmerella*	*Starmerella bacillaris*	*Candida zemplinina*	CBS9494
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycodaceae*	*Hanseniaspora*	*Hanseniaspora guilliermondii*		CBS465
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycodaceae*	*Hanseniaspora*	*Hanseniaspora occidentalis*		CBS2592
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycodaceae*	*Hanseniaspora*	*Hanseniaspora opuntiae*		CBS8733
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycodaceae*	*Hanseniaspora*	*Hanseniaspora osmophila*		CBS313
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycodaceae*	*Hanseniaspora*	*Hanseniaspora uvarum*		CBS314
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycodaceae*	*Hanseniaspora*	*Hanseniaspora vineae*		CBS2171
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycodaceae*	*Saccharomycodes*	*Saccharomycodes ludwigii*		CBS821

Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Trichomonascaceae*	*Wickerhamiella*	*Wickerhamiella azyma*	*Candida azyma*	CBS6826
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Trigonopsidaceae*	*Trigonopsis*	*Trigonopsis vinaria*		CBS4077
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Zygosaccharomyceae*	*Zygosaccharomyces*	*Zygosaccharomyces rouxii*		CBS732
Basidiomycota	*Cystobasidiomycetes*	*Cystobasidiales*	*Cystobasidiaceae*	*Cystobasidium*	*Cystobasidium minutum*		CBS319
Basidiomycota	*Cystobasidiomycetes*	*Cystobasidiales*	*Cystobasidiaceae*	*Cystobasidium*	*Cystobasidium slooffiae*		CBS5706
Basidiomycota	*Microbotryomycetes*	*Sporidiobolales*	*Sporidiobolaceae*	*Rhodotorula*	*Rhodotorula babjevae*		CBS7808
Basidiomycota	*Microbotryomycetes*	*Sporidiobolales*	*Sporidiobolaceae*	*Rhodotorula*	*Rhodotorula glutinis*		CBS20
Basidiomycota	*Microbotryomycetes*	*Sporidiobolales*	*Sporidiobolaceae*	*Rhodotorula*	*Rhodotorula nothofagi*		CBS8166
Basidiomycota	*Microbotryomycetes*	*Sporidiobolales*	*Sporidiobolaceae*	*Sporobolomyces*	*Sporobolomyces coprosmae*		CBS7899
Basidiomycota	*Microbotryomycetes*	*Sporidiobolales*	*Sporidiobolaceae*	*Sporobolomyces*	*Sporobolomyces roseus*		CBS486
Basidiomycota	*Tremellomycetes*	*Cystobasidiales*	*Mrakiaceae*	*Mrakia*	*Mrakia frigida*		CBS5270
Basidiomycota	*Tremellomycetes*	*Filobasidiales*	*Filobasidiaceae*	*Filobasidium*	*Filobasidium magnum*		CBS140
Basidiomycota	*Tremellomycetes*	*Filobasidiales*	*Filobasidiaceae*	*Naganishia*	*Naganishia albida*		CBS142
Basidiomycota	*Tremellomycetes*	*Tremellales*	*Cryptococcaceae*	*Cryptococcus*	*Cryptococcus neoformans*		CBS10083
Basidiomycota	*Tremellomycetes*	*Tremellales*	*Rhynchogastremaceae*	*Papiliotrema*	*Papiliotrema flavescens*		CBS942
Basidiomycota	*Tremellomycetes*	*Tremellales*	*Rhynchogastremaceae*	*Papiliotrema*	*Papiliotrema laurentii*		CBS139
Basidiomycota	*Tremellomycetes*	*Tremellales*	*Rhynchogastremaceae*	*Papiliotrema*	*Papiliotrema terrestris*		CBS10810

Table 8. Espèces trouvées dans les levains et utilisées dans les communautés synthétiques (mocks) du vin.
Pour chaque espèce est indiquée sa taxonomie, e.g. phylum, classe, ordre, famille, genre et son numéro d'accession CBS de l'Institut Westerdijk.
La colonne « Synonym species » indique le synonyme de certaines espèces

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Synonym species	CBS
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Kurtzmaniella*	*Candida santamariae*	*[Candida] santamariae*	CBS4515
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Debaryomycetaceae*	*Yamadazyma*	*Candida aaseri*	*[Candida] aaseri*	CBS1913
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Dipodascaceae*	*Geotrichum*	*Geotrichum klebahnii*		CBS179.30
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Metschnikowiaceae*	*Aciculoconidium*	*Aciculoconidium aculeàum*		CBS5578
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Phaffomycetaceae*	*Barnettozyma*	*Barnettozyma californica*		CBS252
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Phaffomycetaceae*	*Cyberlindnera*	*Cyberlindnera mrakii*		CBS1707
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Pichiaceae*	*Kregervanrija*	*Kregervanrija fluxuum*		CBS2287
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Pichiaceae*	*Nakazawaea*	*Nakazawaea holstii*		CBS4140
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Pichiaceae*	*Sàurnispora*	*Sàurnispora diversa*		CBS4074
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Kluyveromyces*	*Kluyveromyces dobzhanskii*		CBS2104
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Kluyveromyces*	*Kluyveromyces lactis*		CBS683
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Lachancea*	*Lachancea fermentài*		CBS707
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetaceae*	*Lachancea*	*Lachancea waltii*		CBS6430
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetales incertae sedis*	*Diutina*	*Diutina càenulàa*	*Candida càenulàa*	CBS565
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetales incertae sedis*	*Starmerella*	*Candida lactis-condensi*	*[Candida] lactis-condensi*	CBS52
Ascomycota	*Saccharomycetes*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycodaceae*	*Hanseniaspora*	*Hanseniaspora valbyensis*		CBS479
Ascomycota	*Schizosaccharomycetes*	*Schizosaccharomycetales*	*Schizosaccharomycetaceae*	*Schizosaccharomyces*	*Schizosaccharomyces japonicus*		CBS354
Basidiomycota	*Microbotryomycetes*	*Sporidiobolales*	*Sporidiobolaceae*	*Rhodotorula*	*Rhodotorula diobovàa*		CBS6085
Basidiomycota	*Tremellomycetes*	*Filobasidiales*	*Filobasidiaceae*	*Naganishia*	*Naganishia globosa*		CBS5106

Table 9. Espèces trouvées dans les levains et utilisées dans les communautés synthétiques (mocks) de la drosophile.
Pour chaque espèce est indiquée sa taxonomie, e.g. phylum, classe, ordre, famille, genre et son numéro d'accession CBS de l'Institut Westerdijk.
La colonne « Synonym species » indique le synonyme de certaines espèces

Region amplifiée	Amorces	Séquence	Référence
ITS (ITS1- 5.8S - ITS2)	ITS1F	5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3'	White et al., 1990
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATGAAGC-3'	
ITS1	ITS1F	5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3'	White et al., 1990
	ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCACGAGC-3'	Buée et al. 2009
LSU (D1D2)	NL1	5'-GCAACAAAAGCGGAGGAAAAG-3'	O'Donnell et al., 1993
	NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	
RPB2	RPB2-5F	5'-GAYGAYMGWGACAYTTYGG-3'	Liu et al 1999
	RPB2-7cR	5'-CCCARGCTTGYTTRCCCA-3'	
LSU	LSU-LROR	5'- ACCCGCTGAACTTAAGC-3'	Vilgalys and Hester, 1990
	LSU-LR5	5'- TCCTGAGGGAAACTTCG-3'	
ITS2	ITS3	5'-GCACGAGAAGAACGCAGC-3'	Toju et al., 2012
	ITS4_KYO1	5'- TCCTCCGCTTWTTGWTWTGC-3'	

Table 10. Liste des amorces utilisées

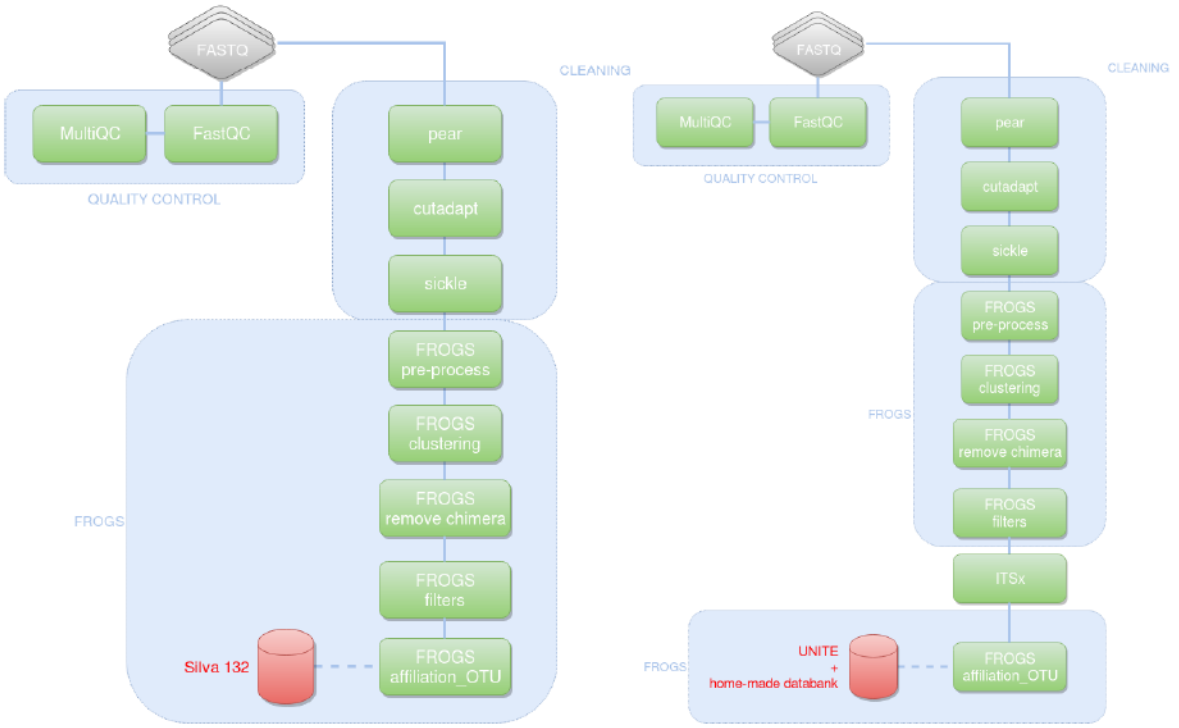


Figure 26. Pipelines d'analyses lors des études de métabarcoding

4.6. Analyse de méthodes culturales uniquement pour les levains

4.6.1. Dénombrement et isolement des bactéries et levures

Un échantillon de levain est mélangé avec une solution saline, puis homogénéisé dans un Stomacher. Cet échantillon est soumis à dilutions décimales puis ensemencé sur boîte de Petri. Une étude de 2009 a comparé 6 milieux de culture pour l'isolement des Lactobacilles des levains (Vera et al., 2009), les milieux MRS (Gélose de Man, Rogosa, Sharpe), MRS complémenté en maltose, SDB (SourDough Bacteria), SFM (the Sanfrancisco Medium), MRS ''Vogel'' (Vogel et al., 1994), MRS5 où est ajouté au MRS du maltose, du fructose, du glucose, de la cystéine et un mix de vitamines (Meroth et al., 2003) and Rogosa. Ils concluent que les milieux MRS et MRS5 sont les plus adaptés, notamment pour la bactérie *Lactobacillus sanfranciscensis* difficile à cultiver. Nous avons utilisé un milieu MRS avec l'ajout de maltose et cystéine. C'est un milieu MRS amélioré, moins complexe que le MRS5 et adapté au milieux céréaliers. Le milieu YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) est un milieu complet pour la croissance des levures. Il a été utilisé pour dénombrer les levures des levains, c'est-à-dire estimer le nombre de levure / gramme de levain.

4.6.2. Extraction d'ADN de chaque espèce

Après isolement de colonies de bactéries et de levures sur les boîtes de Petri, l'ADN de chaque isolat est extrait avec des kits spécifiques. Un marqueur de l'ADN est amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) puis séquencé par un séquençage Sanger. La séquence d'ADN est ensuite comparée sur des bases de données et l'isolat est identifié au genre ou à l'espèce. Si le premier marqueur ne discrimine pas à l'espèce, un autre marqueur est amplifié et séquencé. Ces méthodes sont utilisées et décrites plus précisément dans les chapitres III et IV.

5. Caractérisation des farines

5.1. Granulométrie, analyse de l'activité enzymatique

La granulométrie permet d'avoir le diamètre moyen des grains de farine. L'échantillon de farine diluée dans l'éthanol est passé devant un faisceau laser mesurant la diffraction de la lumière. Le diamètre moyen du grain est obtenu par la mesure de la taille du grain et de sa dispersion. Par ailleurs, l'indice de chute de Hagberg permet de mesurer de façon indirecte l'activité des enzymes du grain. Un indice faible traduit une activité amylasique importante.

5.2. Analyse des protéines par chromatographie en Size-exclusion HPLC (SE-HPLC)

La chromatographie SE-HPLC permet de séparer les composants de la farine. Les farines sont lyophilisées, les protéines solubles extraites dans un tampon phosphate. Les protéines insolubles sont extraites par sonication du culot restant. Les échantillons passent dans une colonne d'élution puis sont séparés en fonction de la taille des protéines. Les gluténines de haut poids moléculaire sont éluées en premier, suivies des gluténines de haut poids moléculaire, des ω-gliadines, puis des γ- et α-gliadines et enfin des peptides, albumines, petites protéines (Figure 27).

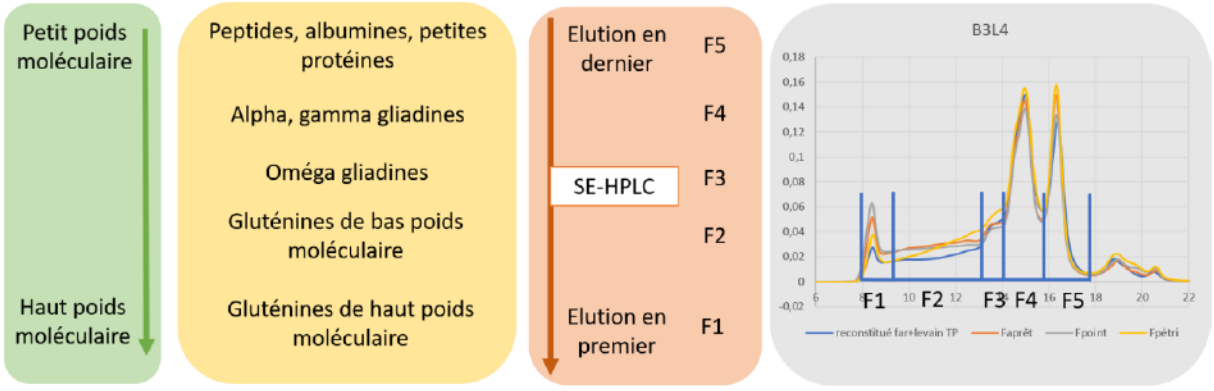


Figure 27. Profil d'une chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et d'exclusion par la taille (SE).

5.3. Le taux de cendres

Le taux de cendres de la farine est une indication de la teneur en minéraux de la farine. Le décret n°63-720 du 13 juillet 1963, détermine les différents types de farine et les taux de cendres correspondants, exprimé en pourcentage de matière sèche. Le taux de cendres des farines est le rapport de la masse de cendres restantes après incinération d'une masse de farine pendant une heure à 900°C (méthode de détermination décrite dans la norme AFNOR NF V 03-720 / Méthode A de la norme ISO 2171). Il existe 6 types de farines homologuées pour le blé associées à un taux de cendres (Table 11). Une farine de type T45 sera blanche, raffinée mais avec une teneur en minéraux modeste. Une farine type 110 contiendra plus de fibres et de minéraux, contenu principalement dans le son, enveloppe du grain de blé qui se sépare de l'amande farineuse lors de la mouture.

Type de farines de blé	Taux de cendres
Type 45	Inférieur à 0,50 %
Type 55	De 0,50 à 0,60 %
Type 65	De 0,62 à 0,65 %
Type 80	De 0,75 à 0,90 %
Type 110	De 1,00 à 1,20 %
Type 150	Supérieur à 1,40 %

Table 11. Les 6 types homologuées de farines pour le blé et leur taux de cendres associés

5.4. Analyse des capacités d'absorption d'eau des farines par le Mixolab

Le Mixolab (Chopin Technologies, France) est un pétrin enregistreur mesurant le comportement rhéologique de la pâte. Il mesure l'absorption d'eau en rajoutant goutte à goutte l'eau et mesure à quelle durée se crée le réseau de gluten. En d'autres termes, il détermine la quantité d'eau que la farine peut absorber pour obtenir une consistance correspondant à 1.1Nm. Il mesure également la résistance aux pales lors du pétrissage et une élévation de température (« mesure du couple »).

6. Caractérisation des pâtes

6.1. Observations de la pâte à pain

Après les analyses sur la farine, la pâte peut être analysée par des experts qui donnent des notes d'intensité, généralement de 0 à 10. La pâte peut se caractériser de façon générale par la rapidité du lissage, le collant de la pâte, sa consistance, son extensibilité, son élasticité, son relâchement. Pendant le pétrissage, ils peuvent estimer le relâchement pendant la détente ; pendant le pointage, l'allongement, le déchirement, l'élasticité, le collant de la pâte ; le déchirement pendant le façonnage ; le collant de pâte et la tenue de la pâte pendant l'apprêt (Roussel et al., 2010). Les échanges de savoirs sur les pâtes nécessitent de s'accorder sur la signification de chacun de ces mots (extensibilité, élasticité,…). Les échanges sur cette sémantique a fait l'objet de nombreuses discussions et ont alimentés la construction d'un glossaire commun (Chapitre V).

6.2. Suivi de la fermentation

Le suivi de la fermentation a été fait sur les pâtes lors la panification à l'INRA de Nantes :

- par capteurs de pression (dispositif ANKOM). Ce système d'acquisition mesure en continu la pression dans une jarre étanche contenant la pâte à pain. La mesure de pression permet ensuite de déterminer le volume CO_2 /100g de pâte à l'aide de la loi des gaz parfaits (Figure 28.

- par mesureurs de pousse : 10g de pâte sont mis au fond d'un bécher en verre et recouvert d'un piston parfaitement équilibré. Le suivi de la pousse se fait visuellement et la vitesse de la pousse se calcule entre la hauteur initiale et finale de la pâte.

Ces données ne sont pas présentées dans l'article (Chapitre IV) car il n'y a pas de répétition de mesures, mais les observations faites seront prises en compte dans les commentaires.



Figure 28. Système Ankom et analyse de la pâte au toucher

A gauche, système Ankom en arrière-plan et des mesureurs de pousse au premier plan. La photo de droite présente l'analyse de la texture de la pâte après le pointage en cuve.

7. Caractérisation des pains

7.1. Observations des pains

Le pain peut être tout d'abord caractérisé par son aspect visuel, sa couleur, son épaisseur, son croustillant, son développement, sa régularité, sa souplesse et son odeur. A l'aide d'une règle, la hauteur et la largeur des pains et tranches de pain sont mesurées. Le déchirement du pain est noté et la régularité de son alvéolage. La masse volumique des pains est calculée par la différence de masse volumique des graines de colza. Les pains sont coupés en tranche au trancheur, les tranches de pains sont scannées. L'analyse granulométrique par morphologie mathématique ou l'analyse de l'alvéolage a été développée à l'Ecole des Mines de Paris et analyse des variations de teinte de noir, gris et blanc (Devaux et al., 2005; Réguerre et al.).

7.2. Analyses physico-chimiques des pains

Le pH et l'acide titrable totale des pains sont mesurés à partir de 10g de pain homogénéisé avec le Stomacher dans de l'eau. Le pH est mesuré avec un pH-mètre. Le volume d'une solution de NaOH 0.1N ajouté au mélange jusqu'à un pH de 8.3 représente l'acide titrable totale (Titroline SI Analytics). Pour déterminer la teneur en minéraux, des échantillons de pains sont broyés, congelés puis lyophilisés. Les échantillons ont été analysés en spectrométrie d'émission atomique à plasma micro-ondes par l'UMR BPMP / Plateforme SAME (INRA Montpellier). Les résultats sont exprimés en mg d'élément par kilogramme d'échantillon. La concentration en sucres et acides organiques ont été déterminés par chromatographie liquide à haute-pression. Les composés volatils du pain ont été identifiés et quantifiés par chromographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse. Les composés volatiles ont été extrait dans l'espace de tête avec une fibre triphasée SPME. Les composés aromatiques absorbés ont été désorbés dans l'injecteur de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC Trace, Thermoscientific), puis analysés. Les composés ont été séparés sur une colonne DBWAX avec l'hélium comme gaz vecteur. Les composés ont été identifiés par comparaison avec des spectres de NIST, bases de données Wiley et bases de données internes.

7.3. Analyses sensorielles des pains

Enfin, dans le cadre du chapitre IV, les pains ont fait l'objet d'une analyse sensorielle par des panels de jury entraînés ou non entraînés. Les pains sont décrits par des descripteurs « brioché, beurré, acide… » et leur intensité est notée par les juges entraînés. Au cours de nos

expériences, nous avons utilisé la méthode du Napping (Dehlholm et al., 2012; Giacalone et al., 2013) (Figure 29). L'ensemble des échantillons de pains est présenté aux juges non entraînés. Chaque juge positionne l'ensemble des échantillons spatialement sur une nappe (d'où l'origine du mot *Napping*). Les pains qui se ressemblent sont positionnés proches, et ceux qui diffèrent éloignés. Les juges représentent donc spatialement sur une nappe les ressemblances sensorielles qu'ils perçoivent entre les échantillons. Les données sont analysées en analyse factorielle multiple (AFM).





Figure 29. Juges classant les échantillons de pain dans une épreuve de Napping

Annexes 1. Liste des boulangers du projet

Code boulanger	Statut	Levain biologique	Age du levain au moment de la collecte	Localisation géographique
B01	Paysan Boulanger	+	12	Vienne
B02	Paysan Boulanger	+	1	Lot-et-Garonne
B03	Paysan Boulanger	+	17	Isère
B04	Boulanger	+	20	Loire-Atlantique
B05	Boulanger	+	20	Oise
B06	Boulanger	+	1	Aube
B07	Boulanger	+	30	Finistère
B08	Boulanger	+	36	Loire-Atlantique
B09	Paysan Boulanger	+	2	Essonne
B10	Boulanger	+	11	Alpes-de-Haute-Provence
B11	Boulanger	+	10	Saône-et-Loire
B12	Paysan Boulanger	+	13	Ille-et-Vilaine
B13	Boulanger	+	6	Doubs
B14	Boulanger	+	15	Haut-Rhin
B15	Paysan Boulanger	+	3	Hérault
B16	Paysan Boulanger	+	3	Yvelines
B17	Boulanger	+	4	Somme
B18	Boulanger	+	7	Paris
B19	Boulanger	+	4	Aveyron
B20	Paysan Boulanger	+	16	Alpes-Maritimes
B21	Paysan Boulanger	+	11	Morbihan
B22	Paysan Boulanger	+	3	Lot-et-Garonne
B23	Boulanger	+	1	Bas-Rhin
B24	Paysan Boulanger	+	20	Vaucluse
B25	Paysan Boulanger	+	1	Haut-Rhin
B26	Boulanger	+	33	Côtes-d'Armor
B27	Paysan Boulanger	+	non connu	Puy-de-Dôme
B28	Boulanger	+	non connu	Paris
B29	Paysan Boulanger	+	1	Aude
B30	Boulanger	+	24	Savoie
B31	Boulanger	+	22	Haut-Rhin
B32	Boulanger	+	7	Saône-et-Loire
B33	Paysan Boulanger	+	3	Ille et Vilaine
B34	Paysan Boulanger	+	0.5	Hérault
B35	Paysan Boulanger	+	non connu	Loiret
B40	Boulanger	-	non connu	Paris
B41	Boulanger	-	non connu	Lozère
B42	Paysan Boulanger	-	8	Loire
B43	Boulanger	-	6	Gard
B44	Boulanger	-	2	Loire-Atlantique

Annexes 2. Petit guide de collecte des échantillons et des informations pour analyse dans le cadre du projet BAKERY

Objectifs

Analyser la diversité de la flore microbienne du levain tout point, de la farine, de l'eau et la qualité organoleptique des levains et pain (propriétés biochimiques : acidité, contenu en sucre et protéine, contenu en arômes) chez un panel de 30 boulangers et paysans-boulangers.

Analyser les liens entre les pratiques boulangères et la diversité de la flore microbienne du levain tout point, de la farine, de l'eau et la qualité organoleptique des levains et pain.

Mode d'emploi

** Composition du kit*

Dans l'enveloppe blanche à bulle, vous trouverez:

- un tube fin rouge
- un tube large rouge
- un tube large violet
- quatre petits pots rouges: deux marqués COEUR, deux marqués BORD
- un sac congélation
- l'accord de transfert de matériel et une explication de ce à quoi ça nous engage
- une feuille "Commentaire"
- ce petit guide.

** Collecte des échantillons*

Nous vous remercions de bien vouloir prélever dans:

RÉCIPIENT	ÉCHANTILLON	QUANTITÉ
Tube fin à bouchon rouge	EAU utilisée pour les rafraichis	environ jusqu'à la graduation 10 mL
Tube large à bouchon rouge	GRAINS DE BLE utilisé pour la farine, si vous en avez	Le tube
Tube à bouchon violet	FARINE utilisée pour les rafraichis	environ jusqu'à la graduation 40 mL
Pots CŒUR	LEVAIN TOUT POINT pris au cœur du levain	2/3 du chacun des deux pots
Pots BORD	LEVAIN TOUT POINT pris à la surface sur le coté du levain	2/3 du chacun des deux pots
Sac congelation	Pain fait avec le levain tout point dont vous nous donnez un échantillon	environ 250 gr

Accord de transfert de matériel

Nous vous remercions de signer l'accord de transfert de matériel biologique en deux exemplaires et de choisir entre les deux options MTA ouvert et MTA fermé, selon que vous voulez (MTA ouvert) ou pas (MTA fermé) que le matériel puisse être transmis à d'autres chercheurs après vous en avoir informé.

Merci de remplir vos coordonnées page 2, de cocher l'option que vous souhaitez page 3 et de dater, et signer page 6.

Une feuille commentaire

Nous vous remercions de bien vouloir indiquer sur la feuille commentaire

- si vous utilisez de la levure de boulangerie dans votre fournil pour d'autre produit et laquelle
- si vous faites votre levain chef à partir de pate ou de levain tout point
- quelle farine vous avez utilisez pour ce levain tout point : origine, céréale, variété(s), mouture.
- tous commentaires qui vous semblent importants

* *Préparation de l'envoi*

Merci de remettre dans l'enveloppe à bulle, adressée au laboratoire ONIRIS, Nantes:

- Le tube fin rouge
- Le tube large rouge si vous avez des graines
- Le tube violet
- Les quatre petits pots rouges
- Le morceau de pain
- Un exemplaire de MTA signé
- La feuille de commentaire remplie

Envoi

Le transporteur FlashExpress/Fedex passera prélever les échantillons le jour dont nous aurons convenu avec vous. Si le temps entre la panification dont vous nous envoyez les échantillons et le passage du transport excède 12 heures, nous vous prions de bien vouloir conserver l'enveloppe contenant les échantillons au réfrigérateur.

Questionnaire en ligne

Afin que nous puissions analyser les liens entre vos pratiques et la diversité de la flore microbienne de votre levain, merci de remplir le questionnaire en ligne. Pour y accéder il vous suffit de suivre le lien suivant : http://sondage.univ-brest.fr/limesurvey/index.php/636657/lang-fr

Nous vous communiquerons, dès que possible, les résultats des analyses réalisées sur les échantillons que vous nous aurez transmis. Cependant, les analyses des levains et du pain étant longues, il ne nous sera probablement pas possible de vous les transmettre avant l'été. N'hésitez pas à nous contacter si vous souhaitez en discuter avec nous.

Un grand merci pour votre collaboration.

Delphine Sicard, Responsable du projet ANR « BAKERY »

Annexes 3. Accord de transfert de matériel et relatif à l'étude sur la diversité des pratiques boulangères

ACCORD DE TRANSFERT DE MATERIEL

ET RELATIF A L'ETUDE SUR LA DIVERSITE DES PRATIQUES BOULANGERES

Fiche Descriptive du Matériel

donne son accord pour le transfert du matériel biologique décrit ci-après (ci-après
le «Transmettant») au profit de l'Institution et du Demandeur (ci-après collectivement désignés le « **Bénéficiaire** » et décrits ci- après) sous réserve de l'acceptation préalable par le Bénéficiaire des termes et conditions du présent accord (ci-après
« **Accord** »).

Propriété du « Matériel d'Origine »	Mélange de farine, d'eau et de micro-organismes assurant la fermentation Farine issue de blé
Description du « Matériel d'Origine »	Levain tout point, farine, eau, pain
« Adresse » des locaux où les Recherches seront conduites	ONIRIS Nantes UMR SPO INRA Montpellier ITAB
« Informations » relatives au Matériel d'Origine	
Scientifique qui transmettra le Matériel	
Date de transmission	____ /____/ ____
« Recherche » qui sera entreprise par le Bénéficiaire au moyen du Matériel d'Origine	PROJET ANR BAKERY : Diversité et interactions d'un écosystème agro-alimentaire *Blé-Homme-Levain* à faible intran: vers une meilleure compréhension de la durabilité de la filière boulangerie

ENTRE :

Nom du Transmettant : _____

ayant son siège [nom de la boulangerie et adresse] :

_____

_____

Le « Transmettant »

ET

L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE, Etablissement Public à caractère scientifique et technologique, ci-après dénommé « **INRA** », ayant son siège au 147 rue de l'Université, 75338 PARIS CEDEX 07, représenté par **Monsieur François HOULLIER, Président** et par délégation **Delphine Sicard,** UMR Sciences pour l'œnologie 2 place Viala 34060 Montpellier Cedex 027

Le « Bénéficiaire »

Individuellement appelée « la Partie » ou collectivement appelés « les Parties ».

ETANT EXPOSE QUE

Dans le cadre d'un appel à projet, l'INRA participe à la réalisation du projet « BAKERY : Diversité et interactions d'un écosystème agro-alimentaire 'Blé/Homme/Levain' à faible intran: vers une meilleure compréhension de la durabilité de la filière boulangerie ». L'objectif du Projet est d'appréhender la diversité et l'évolution de l'écosystème microbien boulanger et de comprendre l'impact de différents déterminants (terroir, farine, pratique,) sur la biodiversité et le fonctionnement de l'écosystème agroalimentaire.

Pour ce faire, le projet Bakery repose sur la participation d'acteurs de la filière boulangère, dont appartient « Transmettant », qui consistera en (i) la participation aux recherches dont la réalisation d'expérimentation, et/ou ii) la fourniture de matériel biologique, et (iii) la communication d'information sur les pratiques boulangères.

Le « Transmettant » a en sa possession du matériel biologique/végétal constitué par

_____

_____(le « Matériel d'Origine ») tel que décrit dans la fiche descriptive ci- dessus.

Le « Bénéficiaire » est intéressé par le Matériel d'Origine détenu par le Transmettant afin de conduire la Recherche tel que décrite dans la fiche descriptive.

EN CONSEQUENCE, LES PARTIES CONVIENNENT DE CE QUI SUIT :

DEFINITIONS

(i) Informations : toute information verbale ou écrite de nature confidentielle se rapportant au Matériel communiquée par le Transmettant parallèlement à la fourniture du Matériel ainsi que toute information communiquée par le Bénéficiaire concernant la Recherche. Les Informations s'entendent à l'exclusion des réponses données à l'étude relative aux pratiques boulangères.
(ii) Descendant : Descendants non modifiés du Matériel tel que virus issu de virus, cellule issue d'une cellule, ou organisme issu d'un organisme.

(iii) Dérivés non modifiés : Substances créées par le Bénéficiaire qui constituent une sous-unité fonctionnelle non modifiée, ou un produit exprimé par le Matériel d'Origine. A titre d'exemples, les Dérivés non modifiés incluent : les sous-clones de lignées cellulaires non modifiées, sous-produits exprimés par ADN/ARN, ou anticorps monoclonaux sécrétés par hybridome de lignée cellulaire.
(iv)
(v) Matériel : Matériel d'Origine, Descendants et Dérivés non modifiés. Le Matériel n'inclut pas : a) les Modifications, b) les autres substances créées par le BENEFICIAIRE grâce au Matériel et qui ne sont ni des Modifications, ni des

Descendants, ni des Dérivés non modifiés.

(vi) Matériel d'Origine : Le matériel de recherche transféré par le Transmettant accompagné des informations y afférent.

(vii) Modifications : Substances créées par le Bénéficiaire qui contiennent/incorporent le Matériel.

Partenaires de la Recherche : Désigne les tiers, personne physique ou morale, réalisant la Recherche en collaboration ou le Bénéficiaire ou sous ses ordres.

1. OBJET

Le présent Accord vise à définir :

- les conditions de fourniture par le Transmettant du Matériel d'origine au Bénéficiaire ainsi que des modalités d'échange des Informations qui pourront être échangées entre les Parties.
- Les modalités de publications des données collectées au cours
-

2. FOURNITURE DU MATERIEL D'ORIGINE

Le Transmettant s'engage à fournir le Matériel d'Origine au Bénéficiaire après la signature de l'Accord par les deux Parties à l'Adresse du Bénéficiaire dans les conditions prévues au présent Accord.

3. UTILISATION

3.1. Le transmettant fourni le matériel au bénéficiaire en

☐☐ **Dépôt ouvert** : Le matériel pourra être utilisé par l'ensemble des partenaires du projet BAKERY et il pourra être diffusé à des tiers à des fins de recherche, sous réserve qu'il soit informé préalablement à chaque diffusion

☐☐ **Dépôt fermé :** Le matériel pourra être utilisé uniquement par les partenaires de BAKERY pour la réalisation du projet. Tout transfert à des tiers n'est pas autorisé. Le CIRM est autorisé à effectuer des recherches sur ce matériel. Les souches obtenues à partir de ce matériel ne seront pas séquencées.

Le Matériel est fourni au Bénéficiaire sur une base non-exclusive et dans le seul but de la réalisation de la Recherche. En conséquence, le Bénéficiaire s'engage à n'utiliser le Matériel que dans cet objectif. Toutefois, dans la mesure où cela est nécessaire à la réalisation du Projet, le Bénéficiaire est autorisé à transférer le Matériel aux partenaires de la Recherche aux seules fins de la réalisation du Projet à condition d'informer le Transmettant de ces transferts sur demande de celui-ci ou à l'issue du présent Accord.

3.2. Le Bénéficiaire s'engage à ce que le Matériel :

(a) soit utilisé aux fins de la Recherche telle que décrite dans le présent Accord;

(b) ne soit pas distribué ou transmis à une tierce partie dans quelque but que ce soit, à l'exception des Partenaires de la Recherche ayant à en connaitre aux fins de réalisation de la Recherche;

(c) ne soit pas utilisé sur des sujets humains, pour des essais cliniques ou à des fins de diagnostic faisant appel à des sujets humains,

(d) soit utilisé conformément lois et règlements nationaux et internationaux en vigueur et fera son affaire d'obtenir toutes les autorisations nécessaires à la réalisation de la Recherche.

(e) soit utilisé exclusivement chez le Bénéficiaire et par les scientifiques travaillant dans le laboratoire du Bénéficiaire ou sous sa responsabilité directe, ainsi que par les personnels des Partenaires de la Recherche éventuellement impliqués dans la réalisation de la Recherche.

(f) ne soit transféré à des tiers qu'à des fins de recherche, et sous réserve que le transmettant et donné son accord

3.3. Le Bénéficiaire a le droit, sans aucune restriction, d'utiliser et de distribuer les substances qu'il a créées grâce au Matériel d'Origine, dans la mesure où ces substances ne sont pas des Descendants des Dérivés non Modifiés ou des Modifications

3.4. Le Bénéficiaire ne peut EN AUCUN CAS exploiter des Modifications commercialement sans le consentement écrit préalable du Transmettant. Si le Bénéficiaire souhaite utiliser ou obtenir une licence du

Matériel ou des Modifications à des fins commerciales, le Bénéficiaire doit au préalable obtenir une licence auprès du Transmettant étant entendu que le Transmettant n'est en aucun cas tenu d'accorder une telle licence au Bénéficiaire.

3.5. Il est expressément interdit au Transmettant de procéder à des manipulations ou des transformations qui pourraient affecter les droits du Transmettant ou du propriétaire du Matériel sans l'accord écrit et préalable du Transmettant, ou sauf si cela résulte de la Recherche. Le Bénéficiaire n'est pas autorisé non plus à combiner, mélanger ou incorporer le Matériel avec un autre matériel (biologique ou non) sauf pour les besoins de la Recherche définie ci-dessus.

3.6. A l'exception de ce qui est prévu dans le présent Accord, aucune licence expresse ou tacite ou aucun autre droit ne sont accordés au Bénéficiaire sur les brevets, demandes de brevets, secrets commerciaux ou autres droits de propriété du Transmettant, y compris sur les formes altérées du Matériel développées par le Transmettant.

3.7. Le Bénéficiaire sera autorisé à transmettre, aux seules fins de la réalisation de la recherche, le Matériel aux Partenaires de la Recherche à condition que ceux-ci s'engagent à respecter les termes du présent Accord et que le Bénéficiaire en conserve la traçabilité de ces échanges.

4. PROPRIETE

3.8. Le Transmettant est reconnu comme le propriétaire exclusif du Matériel, ou comme étant autorisé à fournir le Matériel et des Informations fournies au Bénéficiaire, ainsi que des éventuels droits de propriété industrielle et intellectuelle y afférents. Le Transmettant conserve la propriété du Matériel, y compris le Matériel contenu ou incorporé dans les Modifications, ainsi que des Modifications non autorisées dans le cadre de la Recherche. En outre, le Transmettant conserve tous droits qui pourraient lui être conférés par les lois de propriété Intellectuelle sur les inventions, notamment brevetables, qui pourraient résulter de l'utilisation par le Bénéficiaire du Matériel d'Origine.

3.9. Le Bénéficiaire conserve la propriété des (a) Modifications, à l'exception du Matériel incorporé ou contenu dans les Modifications, (b) des substances crées dans le cadre de l'utilisation du Matériel, et (c) des connaissances résultant de la Recherche.

4.3 Le Bénéficiaire n'est pas autorisé à inclure, dans une demande de brevet ou dans tout autre titre de propriété industrielle, le Matériel, et/ou les Modifications et/ou les Informations, sauf accord préalable et écrit du Transmettant.

5 CONFIDENTIALITE

3.10. Le Bénéficiaire reconnaît le caractère confidentiel des Informations. Le Transmettant reconnaît quant à lui le caractère confidentiel des Informations transmises au Bénéficiaire.

En conséquence, le Bénéficiaire s'engage :

- à ne fournir le Matériel d'Origine et les Informations qu'aux membres de son personnel permanent ou non permanent et aux Partenaires de la Recherche, ayant besoin d'en connaître et qui acceptent de se soumettre aux dispositions de l'Accord ;
- à prendre toutes les mesures raisonnables pour éviter que ce personnel ne divulgue à des tiers, même à titre gratuit, sans autorisation écrite et préalable du Transmettant, tout ou partie du Matériel et/ou des Informations.

Le Bénéficiaire assume la responsabilité de faire appliquer les obligations de cet Accord vis-à-vis de toute personne ayant accès au Matériel et/ou aux Informations.

De son côté, le Transmettant s'engage à garder strictement confidentielle les Informations reçue du Bénéficiaire concernant la Recherche.

3.11. Les obligations de confidentialité de cet Accord ne s'appliquent pas aux Informations et au Matériel :

- qui sont dans le domaine public au moment de leur divulgation par le Transmettant et/ou le Bénéficiaire;

- qui tombent dans le domaine public sans qu'il y ait violation de l'une quelconque des dispositions du présent Accord ;
- qui ont été légitimement fournis par un tiers n'étant pas soumis à des obligations de confidentialité ;
- qui sont déjà connus par le Bénéficiaire avant l'entrée en vigueur du présent Accord sans avoir été communiqués, directement ou indirectement, par l'une des Parties.

7. PUBLICATIONS

Cet Accord ne saurait empêcher ou différer la publication des résultats de la Recherche résultant de l'utilisation du Matériel ou de ses Modifications. Le transmettant accepte que le Matériel et/ou les Informations puissent faire l'objet d'une divulgation dans la cadre de publications. Dans toutes les publications ayant trait à l'utilisation du Matériel, le Bénéficiaire fera référence de l'origine du Matériel selon les modalités convenues d'un commun accord entre les Parties.

Le Bénéficiaire et les Partenaires de la Recherche pourront librement utiliser les réponses fournis par le Transmettant aux données à l'étude relative aux pratiques boulangères, sous réserve que les publications concernant les résultats de l'étude conservent l'anonymat du Transmettant, sauf accord préalable et écrit de celui-ci.

Sans préjudice de ce qui précède, conformément à la loi « informatique et libertés » du 6 janvier 1978 modifiée en 2004, les personnes physiques représentant le Transmettant qui participent à l'étude relatives aux pratiques boulangères disposent d'un droit d'accès et de rectification de toutes données à caractère personnel concernant le contact personne physique, qu'elles pourront exercer en s'adressant à Delphine Sicard, responsable du programme ANR BAKERY (delphine.sicard@supagro.inra.fr). Par ailleurs, celles-ci demeurent également libres de s'opposer, pour des motifs légitimes, au traitement des données à caractère personnel les concernant.

8. RESPONSABILITES - GARANTIES

7.1. Le Matériel d'Origine fourni ici est de nature expérimentale. Le Transmettant ne donne aucune garantie quant à son utilité, efficacité, non-toxicité, sécurité, ou son adéquation à une destination particulière. Le Transmettant décline toute responsabilité concernant les dommages provoqués par le Matériel d'Origine et les Informations, et par l'usage qui pourrait en être fait.
8.2 Le Transmettant ne garantit pas que le Matériel d'Origine ne porte pas atteinte à tout droit de propriété industrielle ou à un autre droit de propriété.

9. CONDITIONS FINANCIERES

Le Matériel est transmis à titre gratuit

10. DATE D'EFFET - DUREE

11.1 Cet Accord prendra effet à la date de sa signature et prendra fin à l'achèvement de la Recherche effectuée par le Bénéficiaire au moyen du Matériel prévue à la date de signature de présent accord, le 14/01/2018.

10.2. A l'échéance de l'Accord, le Bénéficiaire cessera d'utiliser le Matériel et, selon les instructions du Transmettant, gardera, retournera ou détruira tout Matériel restant. Le Bénéficiaire pourra à sa discrétion et pour les seules Modifications réalisées dans le cadre de la Recherche, détruire ces Modifications ou rester lié par les termes de l'Accord les concernant. Sans instruction du transmettant, le bénéficiaire s'engage à n'utiliser le matériel qu'à des fins de recherche.

10.3 En tout état de cause, les obligations de confidentialité et de secret figurant dans cet Accord seront maintenues tant que les Informations, le Matériel et les Modifications ne seront pas tombés dans le domaine public.

11. LOI APPLICABLE - DIFFERENDS

12.1. Cet Accord est soumis à la loi française. Les Parties feront de leur mieux pour résoudre à l'amiable tout litige quant à l'interprétation ou l'exécution de cet Accord. En cas de désaccord persistant, Les tribunaux français sont seuls compétents pour tout litige relatif à l'interprétation ou à l'exécution de l'Accord que les parties n'auront pu résoudre par voie amiable.

12.2. Le présent Accord constitue l'intégralité de l'Accord entre le Transmettant et le Bénéficiaire en rapport avec son objet et remplace et annule toutes déclarations, négociations, engagements, communications orales ou écrites, acceptations, ententes et accords préalables, relatifs aux dispositions auxquelles cet Accord s'applique ou qu'il prévoit, qu'ils soient ou non incorporés. Si certaines dispositions de cet Accord se trouvent inapplicables pour quelque raison que ce soit, les clauses correspondantes seront modifiées pour les rendre applicables et ces modifications n'affecteront pas l'applicabilité (i) d'une telle clause dans d'autres circonstances ou (ii) les autres clauses en toutes circonstances.

Fait à _____
En deux exemplaires originaux

Le Transmettant

Nom :
En qualité de : Date

:

Le Bénéficiaire

Nom : Delphine Sicard
En qualité de : Directeur de recherche INRA
Responsable du projet ANR BAKERY

Date :

Annexes 4. Fiche synthétique sur les risques de biopiraterie dans le contexte d'analyses génétiques de levains naturels

Quelques définitions

MTA/ATM : signifie Accord de Transfert de Matériel. Il s'agit d'un contrat par lequel une partie s'engage à transférer à une autre partie, à des conditions définies, du matériel (par exemple des semences, des levains, des souches, etc.)
Souche : colonie microbienne isolée à partir d'un levain (levure, bactérie ou champignon)
ADN : molécule support de l'information génétique, porté par chaque cellule biologique, permettant la caractérisation génétique des entités étudiées (levain, souche, etc)
ADN total de levain : ensemble de l'ADN présent dans un levain, toute espèces confondues (levures, bactéries, champignons, etc.).
Centre de Ressource Biologique (CRB) : laboratoire publique responsable de la gestion des collections d'organismes vivants. Ce décline par espèces (CRB pour le blé, CRB ou CIRM pour les levures, CRB ou CIRM pour les bactéries, etc.)

Objectif du document

Ce document donne des clés pour comprendre les liens entre type de MTA, recherche possible et risque de piraterie.
Le travail des chercheurs est contraint par le type de MTA utilisé lors du transfert de levain entre le propriétaire du levain et le chercheur. Dans le cadre du projet BAKERY, deux types de dépôt sont proposés aux propriétaires de levain :

- *Dépôt ouvert. Le matériel est utilisé dans le projet Bakery. Les souches pourront être diffusées à des chercheurs qui ne participent pas au projet BAKERY, après accord du boulanger. Les souches isolées des levains seront conservées par un centre de ressource biologique. L'ensemble des recherches du projet peut être effectué sur ce matériel.*

- *Dépôt fermé. Le matériel n'est utilisé que dans le cadre du projet BAKERY. Aucune souche ne pourra être diffusée en dehors du projet. A la fin du projet, les souches sont détruites si le boulanger le demande. Du fait de ne pas pouvoir diffuser les souches à d'autres chercheurs, certaines recherches ne sont pas publiables et donc ne seront pas conduites par les chercheurs. Les souches isolées des levains ne seront pas conservées*

Il est important pour les propriétaires des levains de savoir, en connaissance de cause, sur quelles questions les chercheurs pourront travailler avec un MTA ouvert ou fermé. Cela permettra de s'engager sur le type MTA et de faciliter le travail des chercheurs, notamment dans la mise en place des dispositifs d'évaluation des levains.

Éléments relatifs au brevet et au risque de biopiraterie

Brevet :

On ne peut pas breveter un génome entier. Il est possible de breveter une séquence associée à une fonction si la fonction est nouvelle (jamais publiée).

Un brevet est établi sur une nouveauté, c'est à dire une propriété jamais publiée. En conséquence, tout ce qui est publié ne peut pas être breveté.

Lorsqu'une publication est faite avec des séquences ou sur des fonctions associées aux souches (capacité à fermenter, à produire des arômes,), il est nécessaire de mettre à disposition de la recherche les souches qui ont été utilisées dans ces analyses. Les personnes qui veulent ces souches doivent signer un MTA qui les engage à ne faire que de la recherche dessus. Mais aucun contrôle ne peut être fait sur le devenir de ces souches.

Biopiraterie :

On appelle ici biopiraterie, les cas où une souche de levure (ou bactérie) est récupérée de façon illégale à partir de levain, de laboratoire, ou de collection. La biopiraterie peut arriver au cours d'échanges de levains entre tout type de personnes. A partir du moment où une souche est diffusée (MTA ouvert), il y a un risque non nul qu'elle soit piratée. Cependant, elle sert aussi à un plus grand nombre de personne et chercheur. Toutes informations publiées sur cette souche la protègent d'un brevet sur les informations publiées uniquement.

Précisions concernant le MTA mis en place dans BAKERY

Type d'analyses envisagées	Méthode	Source de risque de biopiraterie	Type de MTA nécessaire
1. diversité inter spécifique (quelles espèces dans un levain?)	Travail sur les levains. Utilisation de marqueurs moléculaires pour identifier les espèces présentes dans les levains étudiés. Ces marqueurs sont connus et déjà publiés.	Ces marqueurs ne sont pas liés à des fonctions, ce sont des marqueurs neutres. Absence de séquençage. Les souches n'ont pas besoin d'être diffusées en cas de publication.	dépôt fermé et dépôt ouvert
	Travail sur les levains. Analyse de données de séquençage sur des morceaux pris au hasard dans le génome : analyse réalisée sur l'ADN total extrait des levains étudiés.	Pas d'isolement des souches donc absence de risque d'associer à une souche à un gène ou une fonction. Les souches n'ont pas besoin d'être diffusées en cas de publication.	dépôt fermé et dépôt ouvert
	Travail sur souches isolées. Analyse de souches représentant des espèces.	Caractérisation des souches par marqueur, séquençage et/ou par leur fonction. Les souches ont besoin d'être diffusée en cas de publication.	dépôt ouvert
2. diversité génétique intra spécifique (quelle diversité entre individus au sein d'une espèce?)	Travail sur souches isolées. Utilisation de marqueurs neutres pour évaluer les différences entre les souches isolées. Ces marqueurs sont connus, déjà publiés et ne sont pas associés à des fonctions.	Il n'y a pas séquençage et les souches n'ont pas besoin d'être diffusées en cas de publication.	dépôt fermé et dépôt ouvert
	Travail sur souches isolées. Séquençage des génomes entiers pour comparer les différences entre les souches isolées. *Les séquences ne sont pas associées à une fonction.*	La séquence doit être publiée en cas de publication. La souche doit pouvoir être diffusée en cas de publication. Le chercheur (publique ou privé) intéressé doit signer un MTA qui l'engage à n'utiliser la souche que pour ses recherches mais il peut faire les recherches qu'il veut dessus.	dépôt ouvert
3. étude de la compétition et de la coopération entre les espèces (comment se comportent des espèces entre elles?)	Travail sur souches isolées. Certains gènes peuvent être séquencés. *Les séquences sont associées à une fonction.* Le séquençage des génomes entiers peut aussi être nécessaire.	La séquence doit être publiée et la souche rendue disponible avec mise en place d'un MTA en cas de publication. *La publication protège le risque de brevet sur cette séquence et cette fonction.*	dépôt ouvert

Chapitre III. Analyse de la diversité spécifique de levains biologiques français : une approche descriptive

Présentation des parties I et II

Afin d'étudier la diversité microbienne de levains, la farine, l'eau et le levain tout point de 23 artisans-boulangers et 17 paysans-boulangers répartis en France ont été collectés. A ces 33 boulangers s'ajoutent les levains de 5 boulangers utilisant de la farine issue de culture « non-biologique » de blé. Une étude sociologique a permis de recenser les pratiques de chaque boulanger du projet.

La partie I présente la diversité des bactéries lactiques dans ces levains français, décrite par des méthodes cultures-dépendantes et culture-indépendantes (MiSeq, Illumina). Des qPCR spécifiques de *L. sanfranciscensis* ont été réalisées pour estimer la densité de cette bactérie dans les levains. A cela s'ajoutent des analyses physico-chimiques afin de décrire des levains et des pains (pH, TTA, acides organiques, masse volumique des pains). Cette partie a fait l'objet d'un article publié dans International Journal of Food Microbiology (https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.034)

La partie II présente la diversité des levures dans les levains et fait le lien avec les pratiques des boulangers. Cette partie a été menée en collaboration avec des psycho-sociologues qui ont recueilli le matériel à l'aide de l'enquête pratique, d'interviews et au cours de rencontres avec les boulangers ou dans le cadre de l'ANR. Cette partie est en cours de soumission.

Partie I : Diversité des bactéries lactiques dans les levains issus de fermentation naturelle en boulangerie française à faible intrant

Ce chapitre présente les résultats du travail d'identification et de caractérisation des espèces bactériennes dans les levains échantillonnés, dans le cadre du projet ANR Bakery.

Un panel de 16 boulangers a été sélectionné pour cette étude, faisant suite à l'article d'Emilie Lhomme en 2015. Nous avons analysé quantitativement et qualitativement les abondances relatives des bactéries lactiques dans les levains biologiques. Pour décrire la diversité des espèces, nous avons combiné une méthode culture-dépendante pour identifier les isolats, une PCR quantitative pour dénombrer la bactérie *Lactobacillus sanfranciscensis* et un séquençage à haut-débit utilisant la technologie MiSeq. Les données microbiologiques et physico-chimiques (pH, acide titrable totale, acides organiques) ont été traités statistiquement par des analyses en composante principale (ACP) et des classifications hiérarchiques ascendantes.

La bactérie *L. sanfranciscensis* est majoritaire dans les levains : cependant 18 autres espèces bactériennes ont été décrites, notamment chez les artisans-boulangers. Nous avons pu décrire dans certains cas la présence d'autres espèces majoritaires : *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. heilongjiangensis*, *L.xiangfangensis, L. koreensis, L. pontis, Weissella sp. et Pediococcus pentosaceus*. *L. koreensis*, *L. heilongjiangensis* et *L. xiangfangensis* avaient été identifiés dans des produits traditionnels asiatiques et ici pour la première fois dans des levains biologiques. La France héberge une diversité d'espèce et les différentes pratiques boulangères contribuent à la maintenir. La diversité des espèces bactéries n'est pas lié à un emplacement géographique. Les pratiques des boulangers et leurs statuts (paysans-boulangers, artisans-boulangers) ne semblent pas être significativement reliées à la diversité des bactéries lactiques et aux caractéristiques des levains et des pains.

Characterization of relative abundance of Lactic Acid Bacteria species in French organic sourdough by cultural, qPCR and MiSeq high-throughput sequencing methods

Elisa Michel [a,b], Clarisse Monfort [a], Marion Deffrasnes [a], Stéphane Guezenec [b], Emilie Lhomme [a], Matthieu Barret [c], Delphine Sicard [b], Xavier Dousset [d], Bernard Onno [a]

[a] Oniris, Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, Rue de la Géraudière CS 82225, 44322 Nantes Cedex 3, France

[b] INRA, UMR Sciences pour l'œnologie, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 01, France

[c] INRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 42 rue Georges Morel, 49007 Beaucouzé Cedex, France

[d] SECALIM Unit UMR1014,Oniris, INRA, Université Bretagne Loire, Nantes, France.UMR INRA 1014 Secalim, La Chantrerie CS, 40307 Nantes Cedex 3, France

Corresponding author: Bernard Onno, Xavier Dousset

Oniris, Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, CS 82225, 44322 Nantes Cedex 3

E-mail address: bernard.onno@oniris-nantes.fr, xavier.dousset@oniris-nantes.fr

Published in International Journal of Food Microbiology

https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.034

Abstract

In order to contribute to the description of sourdough LAB composition, MiSeq sequencing and qPCR methods were performed in association with cultural methods. A panel of 16 French organic bakers and farmer-bakers were selected for this work. The lactic acid bacteria (LAB) diversity of their organic sourdoughs was investigated quantitatively and qualitatively combining *(i) Lactobacillus. sanfranciscensis*-specific qPCR, *(ii)* global sequencing with MiSeq Illumina technology and *(iii)* molecular isolates identification. In addition, LAB and yeast enumeration, pH, Total Titratable Acidity, organic acids and bread specific volume were analyzed. Microbial and physico-chemical data were statistically treated by Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Ascendant Classification (HAC). Total yeast counts were 6 $\log_{10}$ to 7.6 $\log_{10}$ CFU/g while LAB counts varied from 7.2 $\log_{10}$ to 9.6 $\log_{10}$ CFU/g. Values obtained by *L. sanfranciscensis*-specific qPCR were estimated between 7.2 and 10.3 $\log_{10}$ CFU/g, except for one sample at 4.4 $\log_{10}$ CFU/g. HAC and PCA clustered the sixteen sourdoughs into three classes described by their variables but without links to bakers' practices. *L. sanfranciscensis* was the dominant species in 13 of the 16 sourdoughs analyzed by Next Generation Sequencing (NGS), by the culture dependent method this species was dominant only in only 10 samples. Based on isolates identification, LAB diversity was higher for 7 sourdoughs with the recovery of *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. heilongjiangensis*, *L.xiangfangensis, L. koreensis, L. pontis, Weissella sp. and Pediococcus pentosaceus*, as the most representative species. *L. koreensis*, *L. heilongjiangensis* and *L. xiangfangensis* were identified in traditional Asian food and here for the first time as dominant in organic sourdough. This study highlighted that *L. sanfranciscensis* was not the major species in 6/16 sourdough samples and that a relatively high LAB diversity can be observed in French organic sourdough.

Keywords: organic sourdough, Lactic Acid Bacteria, molecular characterization, qPCR, MiSeq

Introduction

Bread is a staple in many European countries and the production of sourdough breads is part of a cultural and geographical identity (De Vuyst and Neysens, 2005). Despite a number of technical constraints, natural sourdough has advantages such as enhancing bread flavor, prolonging the shelf life, improving the dough structure as well as increasing the nutritional value (Minervini et al., 2014). The microbiota of a stable sourdough principally consists of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts (Huys et al., 2013). New species of the genus *Lactobacillus* have been isolated from traditional sourdoughs and various studies on sourdough from different countries have been conducted to isolate a wide range of LAB (De Vuyst and Vancanneyt, 2007). Although they mostly belong to the genus *Lactobacillus*, other genera such as *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* and *Enterococcus* have also been identified (Gobbetti and Gänzle, 2012b). Many species have been found, such as *L.sakei*, *L. crustorum, L. nantensis, L. mindensis, L. reuteri,, L. brevis, L. plantarum, L. buchneri, L. curvatus, L. panis*, *L. pontis*, *L. sanfranciscensis*, *L. spicheri*, *L. kimchi*, *L. amylovorus*, *L. casei, W. cibaria*, and *W. confusa* (De Vuyst et al., 2014a; Gobbetti and Gänzle, 2012b). For yeasts, the six most common yeast species found in stable sourdoughs are *S. cerevisiae*, *Kazachstania exigua*, *Candida humilis*, *Pichia kudriavzevii*, *Torulaspora delbrueckii*, and *Wickerhamomyces anomalus* (De Vuyst et al., 2014a). Regarding French ones, *L. plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* were found to be dominant (Robert et al., 2009b). Other studies revealed a higher diversity with species such as *L.hammesii* and *L.nantensis* (Valcheva et al., 2005, 2006).

For French organic and conventional sourdoughs, recent studies demonstrated that their microbiota contain mainly *L. sanfranciscensis* (Lhomme et al., 2015b, 2015a) and *Kazachstania bulderi* and *K. unispora* as dominant yeast species (Lhomme et al., 2016c). Recently, the rise in culture-independent methods has provided additional data to culture-dependent techniques. Several culture-independent techniques such as pyrosequencing (Bessmeltseva et al., 2014; Ercolini et al., 2013; Lattanzi et al., 2013; Lhomme et al., 2015a), MiSeq ((Minervini et al., 2015b), HRM-qPCR (quantitative High Resolution Melting PCR) (Lin and Gänzle, 2014), and quantitative PCR (Lee et al., 2015; Scheirlinck et al., 2009) have been used to study sourdough microbial diversity.

The aim of this paper was to analyze quantitatively and qualitatively the LAB relative abundance of organic sourdoughs. A panel of 16 bakers using natural sourdough and organic flours were selected for this study. They were characterized by their practices (farmer-bakers, artisan-bakers and industrial-bakers) and their geographical location. To describe LAB diversity, we combined (i) sourdough isolate identification, (ii) *L. sanfranciscensis* quantitative PCR and (iii) global sequencing with MiSeq Illumina technology.

Materials and Methods

1.1. Sourdough and bread sampling

Sixteen bakers located in different regions of France were selected (Table 1). They were also chosen because of their bakers' status and related practices: farmer-bakers who produce their own flour (B15, B20, B21, B22, B25 and B27), artisan bakers (B16, B17, B18, B19 and B24) or industrial bakers (B23, B26, B28, B29 and B30). Sourdoughs were collected at the end of the last backslopping as mature sourdoughs (final leavened dough) and final breads were also sampled. Both were stored in sterile vials and conserved at 4 °C until analyses.

Sourdough	**Location of the bakery**	**Bakers Practices**
B15	Hérault	Farmer baker
B16	Yvelines	Baker
B17	Somme	Baker
B18	Paris	Baker
B19	Aveyron	Baker
B20	Alpes-Maritimes	Farmer baker
B21	Morbihan	Farmer baker
B22	Lot-et-Garonne	Farmer baker
B23	Bas-Rhin	Industrial baker
B24	Vaucluse	Baker
B25	Haut-Rhin	Farmer baker
B26	Côtes-d'Armor	Industrial baker
B27	Puy-de-Dôme	Farmer baker
B28	Paris	Industrial baker
B29	Aude	Industrial baker
B30	Savoie	Industrial baker

Table 12. Locations and practices of 16 French bakers

1.2. Microbial analysis

For each sample, sourdough was ten-fold diluted in TS (0.1% tryptone, 0.85% NaCl) and mixed for 2 min with a Stomacher (AES Laboratoire, France). Cascade dilutions were performed from 10^{-2} to 10^{-6} and then plated with a spiral plater (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France) on MRS5 characterized by a vitamin mix addition (Meroth et al., 2003; Vera et al., 2009) for LAB enumeration and YPD (4 g/L Yeast Extract, 8 g/L glucose, 6.8 g/L agar) for yeast enumeration. Plates were incubated for 48 h at 30 °C under anaerobic conditions (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Germany) for LAB and at 26 °C under aerobic conditions for yeast.

After LAB enumeration, approximately 15 bacterial colonies from each sample were selected and, after overnight culture on MRS, maltose (0.05%) and cysteine (1%), these were stored at -80 °C with 40% glycerol. LAB isolates were identified by partial or whole 16S rDNA sequencing. The 16S rDNA (about 1500 bp) of the pure LAB isolates was amplified by PCR as described previously (Jaffrès et al., 2009) from chromosomal DNA using primers fD1 and rD1 (Weisburg et al., 1991). The sequencing primers SP1, SP2, SP3, and SP5 targeting two conserved regions of the 16S rRNA gene were used (Lhomme et al., 2015b).

The partial nucleotide sequence (about 700 bp) of the amplified 16S rDNA gene was determined using the sequencing primer SP1. To confirm species group identity, the whole 16S rDNA gene was sequenced (about 1500 bp) using sequencing primers SP. Forward and reverse sequences obtained with SP1 and SP2 or with SP3 and SP5 (Table 2) were concatenated with BioEdit. A similarity of at least 97.6% to 16S rDNA gene sequences of type strains was used as the criterion for identification (Stackebrandt and Ebers, 2006).

As the 16S rDNA sequence did not discriminate *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus pentosus*, a multiplex PCR targeting the *recA* gene (Torriani et al., 2001) was performed. Three forward primers (para-F, pent-F and F-Plan) specific for each species and a common reverse primer (pREV) were used (Table 2), expecting an amplicon size depending on the species: 107, 218 and 318 bp for *L. paraplantarum*, *L. pentosus* and *L. plantarum*, respectively. In addition, a PCR targeting the *katA* gene (407 bp) was used (Ammor et al., 2005) to discriminate 16S rDNA identification of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* (Table 2).

Primer set	Oligonucleotide sequence	Target gene	Reference
fD1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	16S rRNA gene	Weisburg *et al.,* 1991
rD1	5'-TAAGGAGGTGATCCAGCC-3'		
Sp1	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'	rDNA 16S position 338 forward	Lhomme *et al.,* 2015a
Sp2	5'-ACCGCGGCTGCTGGCACG-3'	rDNA 16S position 514 reverse	
Sp3	5'-GATACCCTGGTAGTCCACG	rDNA 16S position 810 forward	
Sp4	5'-CTCGTTGCGGGACTTAAC-3'	rDNA 16S position 1100	
SP5	5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'	rDNA 16S position 1089 reverse	
702-F	5'-AATTGCCTTCTTCCGTGTA-3'	*katA*	Ammor *et al.,* 2005
310-R	5'-AGTTGCGCACAATTATTTTC-3'		
paraF	5'-GTCACAGGCATTACGAAA AC-3'	*recA*	Torriani *et al.,* 2001
planF	5'-CCGTTTATGCGGAACACC TA-3'		
pentF	5'-CAGTGGCGCGGTTGATAT C-3'		
pREV	5'-TCGGGATTACCAAACATCAC-3'		
21-F	5'-ATGATYGARTTTGAAAAACC-3'	*rpoA*	Naser *et al.,* 2007
23-R	5'-ACYTTVATCATNTCWGVYTC-3'		
LS-1F	5'-TGCAAGCACGTTCTCTAGAAA-3'	*pheS*	Scheirlinck *et al.*, 2009
LS-1R	5'-GAGTTGGATCGTCGGTATCA-3'		
515f	5'-CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'	MiSeq PCR 16S (V4)	Caporaso *et al.,* 2011
806r	5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'		

Table 13: Oligonucleotides primers used for PCR amplification and sequencing

Similarly, as the 16S rDNA sequence did not discriminate all lactic acid bacteria, *rpoA* and *pheS* genes sequencing was performed for *L. koreensis* and *L.heilongjiangensis* identification, using the sequencing primers (Table 2) rpoA-21-F/rpoA-23-R and pheS-21-F and pheS-23-R ((Naser et al., 2007). Identification queries were fulfilled by a BLAST search against the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA), the BIBI (Devulder et al., 2003) and the Ribosomal Data Project (Cole et al., 2011) databases.

Single colonies from pure bacterial cultures grown on MRS plates were transferred onto Biolog universal growth (BUG™) agar (Biolog Inc., Hayward,CA) and incubated at 28°C for 24 h. Colonies were picked using a sterile moistened Biolog cotton swab, suspended in sterile inoculating fluid, IF-A (Biolog Inc., Hayward, CA) and concentration adjusted to match Biolog GEN III turbidity standards. Aliquots of100µL of bacterial suspensions were loaded into each well of the Microplates. Each bacterial isolate was inoculated on a separate Biolog GEN III MicroPlates™. Readings of inoculated Biolog GEN III microplates was performed at 580nm (Tecan Infinite Pro 200, Salzburg, Austria) after 24–48 h of incubation at 30°C. All the wells start out colorless when inoculated. During incubation, there was increased respiration in the wells where cells could use a carbon source and/or grow. Increased respiration causes reduction of the tetrazolium redox dye, forming a purple color. Negative wells remain colorless as did the negative control well with no carbon source. A positive control well was also used as reference for the chemical sensitivity assays.

1.3. Determination of TTA (Total Titratable Acidity), pH, bread mass density and organic acids

Sourdough samples were ten-fold diluted with distilled water and mixed with a Stomacher for 2 min (AES Laboratoire, France). Each sample was analyzed in triplicate with an automatic titrator (pH-Matic 23, Grosseron, Saint-Herblain, France), using a 10-mL volume and N/10 NaOH solution concentration. The results of the TTA assay were expressed in volume of 0.1 M sodium hydroxide used to neutralize a 10 g sample (Romanian Standard Methods 90/2007). To measure the bread specific volume, rapeseed density was used. The bread was added in the same container and the excess seed mass was calculated, expressed in dm^3/kg. To measure organic acids, 6 ml of the homogenized mixture was centrifuged at 13,000 rpm for 5 min at room temperature. The samples were clarified by Carrez reagents I and II (250 µL) and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. The supernatant (water-soluble extract) was then analyzed

for its organic acid concentration; it was diluted with 10 mM H_2SO_4 and analyzed by liquid chromatography using an HPLC system (Zeppa et al., 2001). Acid amounts were expressed as g/kg of sourdough, dough or bread.

1.4. Statistical analysis

LAB and yeast microbial counts, *L. sanfranciscensis* concentration estimation and biochemical characteristics were used as variables for statistical analyses. Principal Component Analysis (PCA) was carried out to describe the relations between sourdough, bread physico-chemical and microbiological variables. Hierarchical Ascendant Classification (HAC) was carried out to cluster sourdoughs and build a partition into homogeneous clusters. These tests were performed using XLstat (Addinsoft, 2007) and Rstudio Version 3.2.5 http://www.rstudio.com/ (Team, 2015).

1.5. Sourdough DNA extraction

Sourdough samples were five-fold diluted in TS (0.1% tryptone, 0.85% NaCl), then Tween80 was added and mixed for 2 min in a stomacher (AES Laboratoire, France). The matrix was transferred to a NucleoSpin® tube. After centrifugation at 8500 rpm for 10 min, the bacterial pellet was taken up in a lysis solution (1 M Tris-HCl, pH 8, 0.1 M Na-EDTA, Triton X100, 100 mg lysozyme/ml, mutanolysin 200 U/ml). The solution was then incubated at 37 °C and a vibratory lysis step using glass beads was performed (mini BeadBeater-8®, Biospec, California, USA). The samples were placed in an ice tray to burst the cells by thermal shock. After addition of 25 µL of proteinase K and 200 µL of AL buffer, the samples were incubated at 56 °C for 1 h then centrifuged for 3 min at 10000 rpm. Two hundred µL of ethanol was added and the mix was transferred to a Qiagen column. Two successive steps of washing with 500 µL of Buffer AW1 and Buffer AW2 were carried out. After each centrifugation (8000 rpm for 1 min), the filtrates were discarded. DNA was eluted in 100 µL of elution solution by centrifugation at 8000 rpm for 1 min. DNA was stored at -20 °C and its concentration and purity were checked using a spectrophotometer (Nanodrop ND-100; Nanodrop Technologies).

1.6. Quantitative PCR to detect *L. sanfranciscensis*

The *pheS* gene was amplified from sourdough DNA with primers LS-1F and LS-1R, as described by (Scheirlinck et al., 2009)). Previously, a standard curve was constructed on a target strain *L. sanfranciscensis* ATCC 43332, in the range 4–10 log CFU/g (Lhomme et al., 2015a). In addition, one non-inoculated dough was used as the negative control. The different bacterial cell densities were plotted against the corresponding CT values (Opticon Monitor Software 3®). Amplification efficiency (E) was calculated as $E = 10^{-1}/\text{slope}$ (Klein, 2002). *L. sanfranciscensis* in the sourdough samples was quantified by qPCR, using the mean values of CT obtained in three independent qPCR experiments.

1.7. Sequencing on MiSeq Illumina

After sourdough DNA extraction, amplicon libraries were constructed following two rounds of PCR amplification. The first step was performed with the PCR primers 515f and 806r (Caporaso et al., 2011) which target the V4 region of the 16S rRNA gene. Forward and reverse primers carried the following 5'-CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'and 5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3' tails, respectively. All PCR reactions were performed with a high-fidelity polymerase (AccuPrime *Taq* DNA Polymerase System; Invitrogen) using the manufacturer's protocol and 2 µl of environmental DNA (approximately 20 ng). Cycling conditions for 515f/806r were adapted from Caporaso et al. (2011). Briefly, reactions were held at 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of amplification at 94 °C (30 s), 50 °C (60 s) and 68 °C (90 s) with a final extension step of 10 min at 68 °C. All amplicons were purified with the Agencourt *AMPure* XP system and quantified with QuantIT PicoGreen. A second round of amplification was performed with 5 µl of purified amplicons and primers containing the Illumina adapters and indexes. PCR cycling conditions were: 94 °C (2 min), followed by 12 cycles of amplification (94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 68 °C for 1 min) and a final extension step at 68 °C (10 min). All amplicons were purified and quantified as previously described. The purified amplicons were then pooled in equimolar concentrations and the final concentration of the library was determined using a Kapa qPCR Quantification Kit. Amplicon libraries were mixed with 5% PhiX control according to the Illumina protocols. The sequencing run was performed with MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles) (Barret et al., 2015b).

1.8. Sequence analyses

Raw reads were analyzed using the steps described in the standard operating procedure of Mothur at http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP (Kozich et al., 2013). Briefly, 16S rRNA gene sequences were aligned against the 16S rRNA gene SILVA alignment using Mothur v1.33 (Schloss et al., 2009). Chimeric sequences were detected with UCHIME (Edgar et al., 2011) and subsequently removed from the dataset. Taxonomic affiliation of 16S rRNA genes was performed with a Bayesian classifier (Wang et al., 2007) (80% bootstrap confidence score) against the 16S rRNA gene training set (v9) of the Ribosomal Database Project (Cole et al., 2011). Unclassified sequences or sequences belonging to Eukaryota, Archaea, chloroplasts or mitochondria were discarded. Sequences were assigned to operational taxonomic units (OTUs) at 97% identity. Only abundant OTUs representing at least 0.1% of the library size were conserved for microbial community analyses (Barret et al., 2015b). Taxonomic affiliation of these OTUs was done using BLAST+ and RDP against the different databases: NCBI, BIBI and RDP (Cole et al., 2011; Devulder et al., 2003; 2013).

Results and discussion

1. Enumeration of total LAB and yeast microflora

The number of total LAB enumerated on MRS5 medium ranged from 7.19 $\log_{10}$ to 9.62 $\log_{10}$ CFU with a mean value of 8.92 (Table 3). Sourdough B29 presented a low concentration, 7.19 $\log_{10}$ CFU/g of LAB, in comparison with other sourdoughs. The yeast population ranged from 5.92 $\log_{10}$ to 7.68 $\log_{10}$ CFU/g, with a mean value of 7.19. The yeast/LAB ratio ranged from 0.15% to 66.07%. Most sourdoughs present a low ratio < 10%, except for B22 and B29 (38.9% and 66.07% respectively). These results are consistent with those previously found for French and European sourdoughs (Gobetti et al., 1994; Lhomme et al., 2015a).

2. Physical and chemical characteristics

TTA acidity, pH and bread specific volume are presented in Table 3. The pH of the sourdoughs ranged from 3.62 to 4.03, the breads from 3.98 to 4.96. Similarly, the TTA varied from 13.3 to 21.3 and 6.9 to 10.5 mL NaOH 0.1N for sourdoughs and bread, respectively. These

are expected values. Dough acidity is mostly due to the metabolic activity of LAB (Banu et al., 2011)). This lower bread acidity is related to the dilution of the sourdough during its incorporation into the dough. The short fermentation time of the final dough (approximately 4 hours) prevents sufficient production of organic acids and a part is lost by volatilization during baking. TTA values vary depending on the nature of flours (Banu et al., 2011; Katina et al., 2005) and the fermentation temperature: at higher temperature, LAB produce organic acids more efficiently (Minervini et al., 2014). The bread specific volume varied between 1.81 and 2.80 dm^3/kg. These variations are due to the amount and activity of yeasts present in the sourdough and gas production. However, the dough retention capacity and the final volume are also related to flour properties, proteolytic activity (Thiele et al., 2002) and baking practices. Lactic acid values varied from 3.37 to 11.96 g/kg and acetic acid values from 0.91 to 4.44 g/kg. The fermentative quotient varied from 1.06 to 5.66; these are expected values consistent with previous observations (Lhomme et al., 2015b; Valmorri et al., 2010). The sourdough and bread samples studied here come from different bakers using different flours, with different baking practices in terms of temperature and the proportion of sourdough used in the final dough. These variable conditions explain the physico-chemical differences observed.

3. Estimated number of *L. sanfranciscensis* in sourdough by quantitative PCR

Because of the predominance of *L. sanfranciscensis* in French organic sourdough (Lhomme et al., 2015a), the qPCR technique was used to assess the *L. sanfranciscensis* population in sourdoughs (Gobbetti and Corsetti, 1997; Lee et al., 2015). (Scheirlinck et al., 2009) showed the value of this method to estimate quickly the presence and amount of this species in a sample. Here, *L. sanfranciscensis* qPCR estimates varied from 4.41 to 10.29 $\log_{10}$ CFU/g (Table 4). For 13/16 sourdoughs (all but B23, B25, B28), the number of *L. sanfranciscensis* estimated by qPCR represented more than 90% (qPCR / total LAB ratio > 0.9) of the total number of LAB (Table 4), showing that *L. sanfranciscensis* was the main LAB species in these sourdoughs. These results are consistent with those found by Lhomme et al. (2015b), in which *L. sanfranciscensis* was predominant in 10/15 sourdoughs analyzed.

The observed overestimation (ratio > 1) of *L. sanfranciscensis* by qPCR compared to the total number of LAB for 7/16 samples (Tables 3 and 4), may be related to an underestimation of the LAB enumeration due to the selectivity of the medium MRS5. However, this medium is the most suitable to enable isolation of specific LAB species in bread sourdough (Vera et al., 2009).

Sourdough samples	LAB enumeration (log CFU/g)	Yeast enumeration (log CFU/g)	Ratio Yeast/ LAB (%)	Sourdough pH	Sourdough TTA	Sourdough Acetate (g/kg)	Sourdough Lactate (g/kg)	Sourdough Fermentative Quotient	Bread pH	Bread TTA	Bread Specific Volume (dm^3/kg)
B15	9.42 ± 0.03	7.64 ± 0.08	1.66	3.82 ± 0.01	18.3 ± 6.12	1.57 ± 0.08	3.37 ± 0.02	1.28	ND	ND	ND
B16	9.11 ± 0.04	7.67 ± 0.12	3.63	4.02 ± 0.01	13.4 ± 2.45	ND	ND	ND	4.32 ± 0.01	8.7 ± 0.01	2.8 ± 0.13
B17	9.16 ± 0.10	6.70 ± 0.08	0.35	3.84 ± 0.01	15.0 ± 0.07	0.91 ± 0.02	8.71 ± 0.38	5.66	4.28 ± 0.02	8.7 ± 0.65	1.87 ± 0.15
B18	9.44 ± 0.11	6.99 ± 0.08	0.36	3.98 ± 0.01	14.4 ± 0.32	1.41 ± 0.09	8.74 ± 0.16	3.70	4.87 ± 0.02	7.6 ± 0.08	1.86 ± 0.14
B19	9.62 ± 0.19	7.01 ± 0.04	0.25	4.03 ± 0.01	13.3 ± 0.31	1.53 ± 0.07	5.29 ± 0.07	2.06	4.43 ± 0.01	6.9 ± 0.00	2.49 ± 0.18
B20	9.60 ± 0.10	6.78 ± 0.01	0.15	3.87 ± 0.01	19.8 ± 0.32	ND	ND	ND	4.96 ± 0.00	7.9 ± 0.09	1.81 ± 0.02
B21	8.97 ± 0.14	7.20 ± 0.07	1.69	3.70 ± 0.01	18.1 ± 0.71	1.22 ± 0.01	9.17 ± 0.12	4.47	4.53 ± 0.04	6.9 ± 0.63	1.94 ± 0.00
B22	8.09 ± 0.03	7.68 ± 0.10	38.9	3.70 ± 0.01	14.9 ± 0.3	4.44 ± 0.05	7.62 ± 0.04	1.06	3.98 ± 0.02	9.6 ± 0.14	2.49 ± 0.25
B23	9.02 ± 0.03	7.69 ± 0.12	4.68	3.86 ± 0.00	14.5 ± 0.16	2.62 ± 0.04	7.82 ± 0.07	1.99	4.66 ± 0.00	7.4 ± 0.16	1.83 ± 0.10
B24	8.81 ± 0.04	7.58 ± 0.14	5.89	3.85 ± 0.01	21.3 ± 1.26	2.48 ± 0.01	11.96 ± 0.07	2.87	4.13 ± 0.01	9.6 ± 0.02	1.97 ± 0.04
B25	8.62 ± 0.05	7.43 ± 0.16	6.46	3.80 ± 0.01	14.1 ± 0.16	1.63 ± 0.03	7.10 ± 0.11	2.59	ND	ND	ND
B26	9.29 ± 0.04	7.45 ± 0.13	1.45	3.77 ± 0.01	18.0 ± 0.00	2.19 ± 0.09	10.89 ± 0.13	2.97	4.27 ± 0.01	9.2 ± 0.16	2.23 ± 0.10
B27	9.46 ± 0.01	7.52 ± 0.07	1.15	3.62 ± 0.00	16.5 ± 0.15	1.75 ± 0.03	7.86 ± 0.28	2.66	4.32 ± 0.00	8.8 ± 0.46	2.37 ± 0.53
B28	8.54 ± 0.09	6.74 ± 0.02	1.58	3.64 ± 0.00	19.2 ± 0.16	3.34 ± 0.33	8.31 ± 0.79	1.48	4.76 ± 0.02	8.8 ± 0.17	2.61 ± 0.23
B29	7.19 ± 0.09	7.01 ± 0.02	66.07	3.83 ± 0.00	14.8 ± 0.15	1.62 ± 0.07	8.09 ± 0.01	2.97	4.39 ± 0.02	7.9 ± 0.16	2.22 ± 0.02
B30	8.38 ± 0.35	5.92 ± 0.06	0.35	3.81 ± 0.06	14.8 ± 1.18	1.09 ± 0.02	8.50 ± 0.16	4.65	4.13 ± 0.00	10.5 ± 0.17	2.51 ± 0.52

Table 14: Total LAB and yeast enumeration (log CFU/g); physico-chemical characteristics of sourdoughs and related breads (mean values ± standard deviation). ND: Not determined

Alternatively, the qPCR method can enumerate viable and non-cultivable *L. sanfranciscensis* cells, i.e. living and dead bacteria. In order to differentiate living and dead cells specific PCR and sample treatment with PMA (propidium monoazide) may be combined to determine the viable population quantitatively ((Macé et al., 2013)). (Hierro et al., 2006)), RT-qPCR could be an alternative method to rule out the counting of dead cells.

4. Sourdough isolate identification

To complete and investigate LAB diversity, isolates were identified using 16S rDNA and *rpoA* sequence analysis. The results are shown in Table 4. For 7 sourdoughs (B17, B18, B19, B20, B22, B24 and B27) 100% of isolates belonged to *L. sanfranciscensis* species. For 3 sourdoughs (B26, B21 and B1), *L. sanfranciscensis* represented more than 50% of isolates. For 6 sourdoughs of the 16 studied, *L. sanfranciscensis* was not dominant or absent (B16, B23, B25, B28, B29 and B30).

Sourdough B16 isolates belonged to *L. curvatus* (90%) and *L. plantarum* (10%) species. For sourdough B25, isolates were identified as *L. brevis* (69%), *L. plantarum* (15%), *L. sanfranciscensis* (8%) and *L. paralimentarius* (8%). Sourdough B28 isolates were classified as *L. sanfranciscensis* (40%), *L. pontis* (33%), *L. diolivorans* (13%), *L. paracasei* (7%), and *L. parabuchneri* (7%). Greater genera diversity was observed in the sourdough B30 with *P. pentosaceus* and *Weissella confusa* as the dominant species. In sourdough B29, *L. xiangfangensis* was isolated for the first time in sourdough as the prevailing LAB species.

Finally, sourdough B23 was unique here because of its low value of *L. sanfranciscensis* (4.41 $\log_{10}$ CFU/g) estimated by qPCR compared to a total of 9.02 $\log_{10}$ LAB. Isolates were sorted into 4 distinct groups according to their rDNA 16S sequence homology. The first group was identified as *L. curvatus* by rDNA 16S and *katA* gene absence by PCR amplification (Ammor et al., 2005). For the second group, three species were identified based on 16S sequencing (*L. plantarum*, *L. pentosus, L. paraplantarum*). Using *recA* amplicon size variation (Torriani et al., 2001), the isolates were identified as being *L. plantarum* (amplicon size of 318 bp). Isolates from group 3 were identified by rDNA 16S sequencing as belonging to *L. heilongjiangensis* (100%). Using *rpoA and pheS* genes (Gu et al., 2013; Naser et al., 2007), *L. heilongjiangensis* identity was confirmed with 99% and 96% homology respectively and

distinguished from closely-related LAB species as *L. nantensis*, *L. mindensis, L. crustorum* or *L. farciminis*.

Finally, for group 4, rDNA 16S sequences showed 97% of homology with *L. koreensis* and 95% of homology with *L. parabrevis* using RDP database. With BIBI database, the closest sequence based on patristic distances was *Lactobacillus koreensis* T FJ904277 with 100% of identity. Adding sequencing of *rpoA* gene and *pheS* gene, the presence of *L. koreensis* in sourdough B23 was confirmed. For 7 sourdough samples (B16, B21, B23, B25, B28, B29 and B30), LAB diversity was higher than previously found in French organic sourdoughs (Lhomme et al., 2015b).

The sourdough LAB diversity observed here was characterized by new species isolated in sourdough: *L. xiangfangensis*, *L. heilongjiangensis* and *L. koreensis*. Regarding *L. xiangfangensis*, it has been isolated in Chinese pickles (Gu et al., 2012). Already identified in French sourdough (Lhomme et al., 2015a), its occurrence was confirmed here in two sourdoughs (B21 and B29). It belongs to the *L. plantarum* species group and produces acid from diverse carbohydrate substrates such as ribose, D xylose, glucose, sucrose, fructose, and maltose. Its genome has been sequenced (Sun et al., 2015). *L. heilongjiangensis* had previously been found in traditional Chinese pickles (Gu et al., 2013) and was isolated here for the first time in sourdough (B23). It is a Gram-positive, catalase-negative, non-spore-forming rod and produces acid from many carbon substrates. The metabolic profile of *L. heilongjiangensis* strain revealed the use of mainly glucose, fructose, mannose and sucrose (Table S1). The complete genome is 2.79 Mbp, devoid of plasmids, and with a GC content of 37.5%. Pathways involved in the biosynthesis of riboflavin and folate were identified in the genome of *L. heilongjiangensis* DSM 28069T, which are present in some other probiotic LAB strains (Zheng et al., 2015).

Considering *L. koreensis*, previously isolated from Kimchi (Bui et al., 2011), it was also isolated in sourdough (B23) for the first time. Closely related to *L. brevis*, *L. koreensis* is an heterofermentative species and metabolizes mainly fructose, glucose, and maltose (Table S2). Its genome has been sequenced recently (Sun et al., 2015). The genomic diversity of *L. xianfangensis*, *L. heilongjiangensis* and *L. koreensis* could be described by analyzing and comparing genome sequences. Their genomes were sequenced with 210 other *Lactobacillus* strains by Sun et al., (2015): they presented a robust phylogenomic framework of existing species and for classifying new species.

5. Relative abundance of LAB species estimated by Illumina MiSeq Sequencing

To complement the cultural and molecular approaches, the relative abundance of species in the 16 samples was determined by NGS with Illumina MiSeq technology. A total of 777,750 quality-trimmed sequences of 16S RNA gene amplicons were obtained. The average number of sequences per sample was 51,850. After analysis, a total of 20 OTUs were identified, with a range of 1 to 8 OTUs per sourdough. Table 4 shows the OTUs found with a relative abundance of at least 0.1% for each sourdough.

For 12 sourdoughs, B15, B17, B18, B19, B20, B21, B22, B24, B26, B27, B29, and B30, *L. sanfranciscensis* was present at more than 98%. This OTU was also detected at much lower abundance in B25 and B28 sourdough samples (36.1% and 88.8%, respectively) and at very low abundance in B23 and B16 samples (0.2% and 0.1%, respectively).

With a relative abundance of 75.2%, *L. curvatus* was the predominant species in B16 sourdough. For sourdough B25, the predominant species (61.9%) corresponded to an OTU that was identified only at the taxonomic genus level, *Lactobacillus* sp. Similarly, other OTUs in sourdough B15 (0.1%), B16 (12.0%), B21 (0.1%), B26 (0.6%) and B30 (0.1%) were affiliated only to the genus *Lactobacillus*. Finally, the OTU corresponding to 80.07% in B23 sourdough could not be formally related to a species, but was either *L. koreensis* or *L. brevis*.

In sourdoughs B21, B29 and B30, the same OTU was detected with a relative abundance of 0.1%, 0.2% and 0.1%, respectively. In B23 sourdough, the OTU corresponding to 16.7% could not be related to a species, but was either *L. heilongjiangensis*, *L. farciminis* or *L. crustorum*. Other sub-dominant species detected in the sourdoughs (relative abundance of 0.1%-4.3%) were *Weissella* found in B16 (0.2%) and B30 (0.4%), *Pediococcus pentosaceus* in B30 (0.2%), *L. sakei* in B16 (0.7%), *L. brevis* in B25 (0.9%), *L. nantensis* in B23 (0.8%), *Leuconostoc* in B23 (0.4%), and *L. parabrevis* in B25 (0.6%) and B28 (2.4%). *L. pontis* was detected at a relative abundance of 4.3%, *L. buchneri* at 0.8% and *L. diolivorans* at 2.3%, in B28 sourdough. These Miseq analysis observations could reveal a relatively higher biodiversity considering subdominant LAB species.

6. Comparison of LAB diversity analyzed by the different approaches

Quantitative PCR showed that *L. sanfranciscensis* was the dominant species in 13 of the 16 sourdoughs studied. For 12 of the 13 samples, *L. sanfranciscensis* was also present at a high relative abundance estimated by MiSeq analysis (98.6%), consistent with the qPCR quantification (Table 4). Moreover, a significant correlation was observed between these two

methods (R^2 =0.68, data not shown) in PCA analysis (Figure 1C). For 10 sourdoughs, culture-dependent method confirmed *L. sanfranciscensis* dominance (>50%) and were in agreement with culture-independent methods. Likewise, in sourdough B16, *L. curvatus* was predominant by the molecular method and MiSeq analysis confirming the possible occurrence of this species in sourdough as already described (Lhomme et al., 2015a; Robert et al., 2009b). For sample B28, MiSeq results were partly consistent with the molecular characterization of isolates including *L. sanfranciscensis* dominance. Thus *L. pontis*, *L. diolivorans* and *L. buchneri* related sp. were also identified by these two methods.

Regarding sourdough B25, the results were not totally consistent between MiSeq and the cultural method. While *L. sanfranciscensis* and *L. brevis* were found by both methods, this was not the case for *L. plantarum* and *L. paralimentarius*, only identified as isolates. However, these species might have been classified as *Lactobacillus* species and could not be characterized more precisely by the MiSeq method. The same analysis and comments can be made for B26 and B30. Surprisingly, sourdough B29 analysis revealed a discrepancy regarding MiSeq results and isolate identification. Bias in the DNA extraction, sequence analyses or in sequencing might have occurred. Furthermore, the databases used could be incomplete or may contain poor quality sequences (Ercolini, 2013). Medium composition and strain- specific requirements could also contribute to this divergence.

Finally, the most original sourdough of our study was sample B23. *L. sanfranciscensis* was found with a relative abundance of 0.17% in MiSeq analyses, corresponding to the low population (log 4.41 CFU/g) estimated by qPCR. By molecular analysis of isolates, 37.5% of *L. heilongjiangensis* was found, 25% of *L. plantarum*, 25% of *L. koreensis* and 12.5% of *L. curvatus*. This species might also have been detected by MiSeq analysis. However, the MiSeq method could not discriminate between three closely-related species, due to a too short sequence obtained. MiSeq analysis could be extended to obtain more detailed and specific results by searching for primers amplifying a longer and more discriminating 16S rDNA sequence; or using housekeepings genes as *gyrB* or *rpoA*.

The results obtained here by the three methods partially confirm previous studies for traditional Italian sweet leavened baked goods (Lattanzi et al., 2013) and French organic sourdoughs (Lhomme et al., 2015a). One major point of this work is that LAB species diversity was higher than previously described (Lhomme et al. 2015a) for French organic sourdough. Our results are in agreement with the observations of (Rizzello et al., 2015), showing that *Firmicutes* diversity was the highest for sourdough made with organic durum flours.

Sourdough samples	Quantification of *L. sanfranciscensis* (log CFU/g) by qPCR	Ratio qPCR results/ LAB count	Species relative abundance (%) by NGS Miseq	Species identified in sourdough by biomolecular method
B15	10.29	1.09	*L. sanfranciscensis* (99.8 %), *Lactobacillus sp.* (0.1%)	*L. sanfranciscensis* (86%), *L. plantarum* (14%)
B16	8.41	0.92	*L. sanfranciscensis* (0.1%), *Lactobacillus sp.* (12.0%), *L curvatus* (75.2%), *L. sakei* (0.7%), *Weissella* (0.2%)	*L. curvatus* (90%), *L. plantarum* (10%)
B17	9.27	1.01	*L. sanfranciscensis* (99.8%)	*L. sanfranciscensis* (100%)
B18	9.47	1.01	*L. sanfranciscensis* (99.9%)	*L. sanfranciscensis* (100%)
B19	9.58	0.99	*L. sanfranciscensis* (99.9%)	*L. sanfranciscensis* (100%)
B20	10.06	1.05	*L. sanfranciscensis* (99.7%)	*L.sanfranciscensis* (100%)
B21	9.48	1.05	*L. sanfranciscensis* (99.8%), *Lactobacillus sp.* (0.1%), *L. koreensis* or *L. brevis* (0.1%)	*L.sanfranciscensis* (54%), *L. plantarum* (8%), *L. xiangfangensis* (15%), *L. brevis* (23%)
B22	7.85	0.97	*L. sanfranciscensis* (99.9%)	*L.sanfranciscensis* (100%)
B23	4.41	0.43	*L. koreensis* or *L. brevis* (80.0%), *L. heilongjiangensis* or *L. farminis* or *L. crustorum* (16.7%), *L. nantensis* (0.8%), *Leuconostoc (order)* (0.4%), *L. sanfranciscensis* (0.2%),	*L. heilongjiangensis* (37.5%), *L. koreensis* (25%), *L. plantarum* (25%), *L. curvatus* (12.5%),
B24	8.03	0.91	*L. sanfranciscensis* (99.9%)	*L sanfranciscensis* (100%)
B25	7.40	0.85	*Lactobacillus sp.* (61.9%), *L. sanfranciscensis* (36.1%), *L. brevis* (0.9%)	*L. brevis* (69%), *L. plantarum* (15%), *L. sanfranciscensis* (8%), *L. paralimentarius* (8%)
B26	8.99	0.97	*L. sanfranciscensis* (98.6%), *Lactobacillus sp.* (0.6%), *L. parabrevis* (0.6%)	*L.sanfranciscensis* (75%), *L. plantarum* (25%)
B27	9.09	0.96	*L. sanfranciscensis* (99.8%)	*L.sanfranciscensis* (100%)
B28	7.19	0.84	*L. sanfranciscensis* (88.8%), *L. pontis* (4.3%), *L. parabrevis* (2.4%), *L. buchneri* (0.8%), *L. diolivorans* (2.3%)	*L. sanfranciscensis* (40%), *L. pontis* (33%), *L. diolivorans* (13%), *L. paracasei* (7%), *L. parabuchneri* (7%)
B29	8.23	1.15	*L. sanfranciscensis* (99.6%), *L. koreensis or L. brevis* (0.2%)	*L. plantarum* (9%) , *L. xiangfangensis* (55%), *Leuconostoc citreum* (36%)
B30	9.46	1.13	*L. sanfranciscensis* (99.2%), *Weissella* (0.4%), *Pediococcus pentosaceus* (0.2%), *Lactobacillus sp.* (0.1%), *L. koreensis or L. brevis* (0.1%)	*P. pentosaceus* (55%), *Weisella confusa* (27%), *L. sanfranciscensis* (18%)

Table 15: Microbial diversity of 16 French organic sourdoughs.

Estimation of *L. sanfranciscensis* by qPCR (log CFU/g), relative abundance (expressed as %) of bacterial taxonomic units by the MiSeq method and isolate identification by 16S rDNA sequencing (number of isolates per species / total number of isolates per sourdough)

7. Relationships between bread and sourdough physico-chemical and microbiological characteristics by Hierarchical Ascendant Classification

Hierarchical Ascendant Classification (HAC) was carried out to cluster sourdoughs according to microbial counts, *L. sanfranciscensis* amount estimation (qPCR and MiSeq) and physico-chemical characteristics (Table 3 and 4). Three clusters were differentiated (Figure 1B). Cluster 1 grouped 6 sourdoughs, B15, B22, B24, B26, B27 and B28. Compared to the other clusters, this cluster was characterized by the lowest N LAB values counts and surprisingly the highest sourdough/bread acidity characteristics TTA, pH, acetic acid (Table 3). Four sourdoughs were associated in cluster 2, B16, B19, B23 and B25. They were characterized by the highest N LAB concentration counts, associated with low values for *L. sanfranciscensis* estimation (qPCR, Miseq Relative Abundance). For this cluster low acidity values were observed (sourdough /bread pH and TTA, lactic acid concentration). Enumeration media selectivity and intraspecific LAB diversity could explain these results (Foschino et al., 2001; Venturi et al., 2012a). Finally, cluster 3 grouped the remaining sourdoughs B17, B18, B20, B21, B29 and B30. They were characterized by yeast counts, high *L. sanfranciscensis* estimation (qPCR, Miseq Relative Abundance), low acetic acid concentration and high Fermentative Quotient. Furthermore, in this cluster the low number of yeasts could be related to the low bread volume. Regarding acetic acid concentration, the low number of yeasts for cluster 3 could have an impact on fructose production through sucrose metabolism (Gobetti et al., 1994; Meignen et al., 2001; Stolz et al., 1995). Overall, it is quite difficult to evaluate the relative contribution of LAB and yeasts for a given sample in terms of lactic and acetic acids balance.

HAC clustering (Table 5, Figure 1B) was completed by PCA analysis (Figure 1C). Miseq and qPCR *L. sanfranciscensis* estimation are statistically linked and also correlated with sourdough TTA. These results might be explained by the acidification capacity of *L. sanfranciscensis* in sourdough (Gobbetti and Corsetti, 1997). Surprisingly, acetic acid concentration was not related to microbiological counts and *L. sanfranciscensis* estimation. Yeast LAB interactions might explain these unexpected results. Furthermore, bakers' practices or status as defined in this study - farmer-bakers, industrial-bakers and artisan-bakers – were not significantly different on the physicochemical or microbiological responses considered here (Figure 1D). LAB diversity observed here, could partially explain these results. However, backslopping frequency might influence microbiota and sourdough characteristics (Huys et al., 2013). Moreover, Minervini et al. (2014) had observed relationships between bread physico-

chemical characteristics and sourdough microbiological data and baking practices during the traditional sourdough process.

Conclusion

The aim of this study was to investigate the bacterial biodiversity of 16 French organic sourdoughs. The lactic acid bacteria diversity of these sourdough was investigated quantitatively and qualitatively combining *(i) L. sanfranciscensis*-specific qPCR, *(ii)* global sequencing with MiSeq Illumina technology and *(iii)* molecular isolate identification. Although *L. sanfranciscensis* was still the dominant species in 10 of the 16 sourdoughs studied, LAB species diversity was higher than previously described for French organic sourdough, with 16 different species identified considering all the methods used. Regarding both cultural and non-cultural methods, 6 samples showed a non *L. sanfranciscensis* dominance, whatever the characteristics of baker' practices. This study confirmed that *L. curvatus* could be a predominant species in sourdough. Furthermore, *L. xianfangensis*, *L. heilongjiangensis* and *L. koreensis* were highlighted for the first time in sourdough, having previously only been found in traditional Asian food. Genomics experiments focusing on the genomic diversity of these species will be performed. Finally, bakers' practices and status, as considered here, did not appeared to be significantly related to LAB diversity and sourdough features.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from ANR Bakery–13-ALID-0005 (French National Research Agency), INRA and Oniris. We wish to thank the sixteen bakers as well as Alain and Françoise Bourgeois (Apiliger Earl) for their collaboration on the project, sharing with us their bread-making knowledge and pleasure in good bread. Thanks are also addressed to Marie-Noëlle Madec and Florence Valence-Bertel from INRA Rennes UMR 1253 Sciences et Technologie du Lait et de l'Œuf, Isabelle Hue and Héloïse Debroise from Oniris for their assistance in LAB microbiology, Marc Perez and Thibault Nidelet from INRA Montpellier Science pour l'œnologie for HPLC settings and statistical analyses respectively.

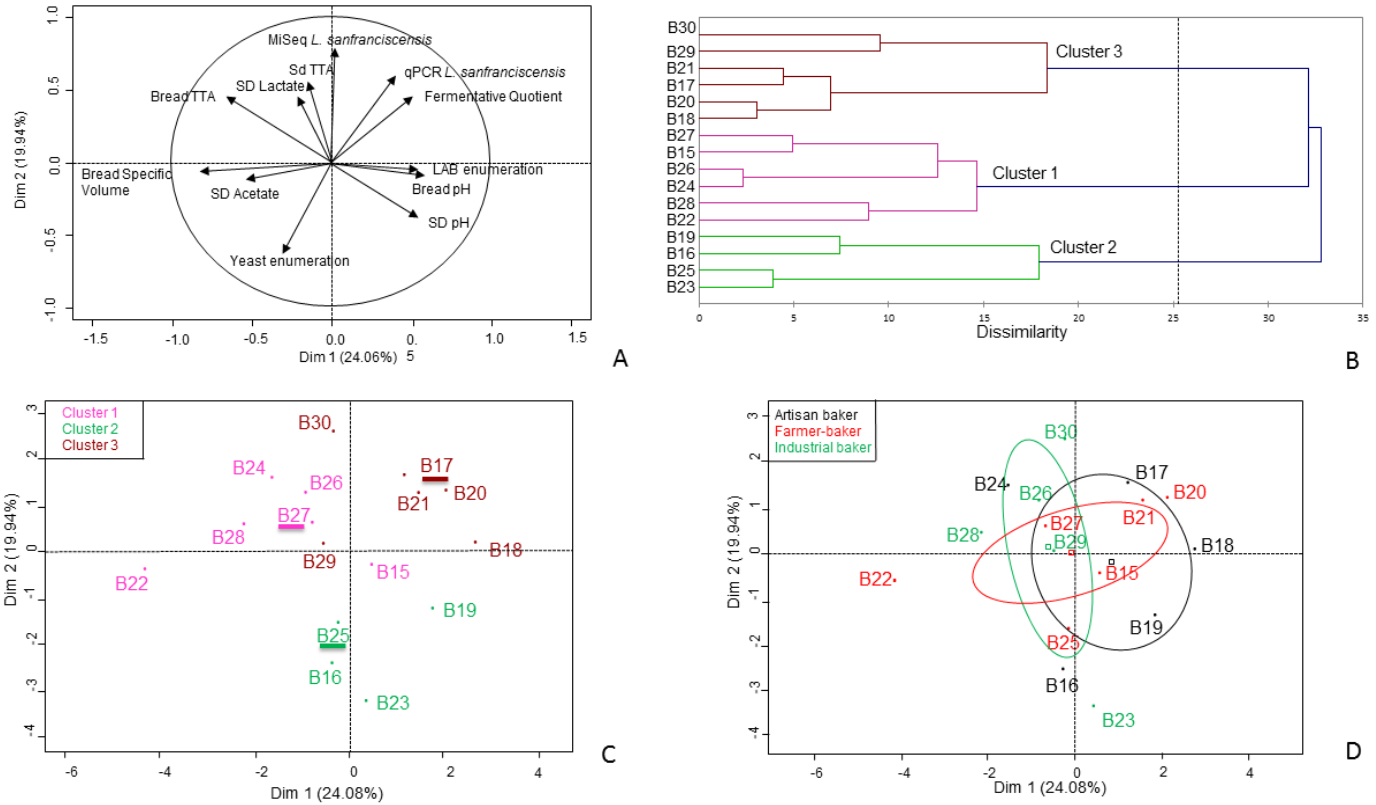


Figure 30. Variables factor map of first and second principal components after Principal Component Analysis (PCA).

This analyze was based on physic-chemical characteristics, microbial counts and *Lactobacillus sanfranciscensis* concentration in 16 sourdoughs (B15 – B30). B) Hierarchical Ascendant Classification of sixteen French organic sourdoughs based on physico-chemical and microbiological criteria. C) Score and loading plots of first and second principal components after Principal Component Analysis (PCA). Underlined data represented centroids samples of HAC clusters: Cluster 1○, Cluster 2○ and Cluster 3 ○

D) Confidence ellipses

Class	N LAB (log CFU/g)	N Yeast (log CFU/g)	qPCR *L. sanfranciscensis* (log CFU/g)	Relative Abundance *L. sanfranciscensis* (%)	Sourdough pH	Sourdough TTA	Sourdough Acetic acid (g/kg)	Sourdough Lactic acid (g/kg)	Fermentative Quotient	Bread pH	Bread TTA	Bread Specific Volume (dm^3/kg)
1	8.34	7.44	8.57	97.8	3.73	18.03	2.63	8.34	2.05	4.29	9.13	2.34
2	9.09	7.45	7.45	34.08	3.93	13.83	1.83	6.38	2.18	4.52	7.60	2.24
3	8.79	6.77	9.33	99.67	3.84	16.15	1.28	8.66	4.19	4.53	8.25	2.04

Table 16: Cluster class centroids obtained by Hierarchical Ascendant Classification based on bread and sourdough physico-chemical and microbiological criteria

Lactobacillus heilongjiangensis

Negative Control	8,86	Sucrose	100,00
D-Raffinose	4,96	N-Acetyl-B-D-Mannosamine	39,16
Alpha-D-Glucose	83,66	L-Fucose	6,38
D-Sorbitol	6,27	D-Fructose-6-PO4	5,78
Gelatin	5,72	L-Histidine	7,27
Pectin	46,14	Mucic Acid	7,35
p-Hydroxy-phenylacetic acid	0,00	D-Malic Acid	4,15
Tween 40	25,30	Propionic Acid	16,60
Dextrin	12,13	D-Turanose	11,34
Alpha-D-Lactose	4,21	N-Acetyl-D-galactosamine	6,57
D-Mannose	81,20	L-Rhamnose	6,42
D-Mannitol	5,29	D-Aspartic Acid	8,05
Glycyl-L-Proline	5,82	L-Pyroglutamic Acid	8,03
D-Galacturonic Acid	6,86	Quinic Acid	4,96
Methyl pyruvate	5,63	L-Malic Acid	16,73
Gamma-Amino-Butryric Acid	10,71	Acetic Acid	15,06
D-Maltose	8,03	Stachyose	7,27
D-Melibiose	4,19	N-Acetyl Neuraminic Acid	1,98
D-Fructose	96,29	Inosine	3,05
D-Arabitol	5,89	D-Serine	11,34
L-Alanine	10,73	L-Serine	13,80
L-Galacturonic Acid Lactone	5,25	D-Saccharic Acid	8,24
D-Lactic Acid Methyl Ester	7,06	Bromo-Succinic Acid	6,55
Alpha-Hydroxy-Butyric Acid	9,50	Formic Acid	11,21
D-Trehalose	39,69	Positive Control	100,00
B-Methyl-D-Glucoside	13,46	1% NaCl	38,74
D-Galactose	17,13	1% Sodium Lactate	59,78
Myo-Inositol	7,03	Troleandomycin	18,94
L-Arginine	12,28	Lincomycin	25,99
D-Gluconic Acid	7,37	Vancomycin	56,94
L-Lactic Acid	13,63	Nalidixic Acid	50,04
Beta-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	10,30	Aztreonam	79,62
D-Cellobiose	21,23	pH 6	98,71
D-Salicin	10,90	4% NaCl	20,54
3-Methyl Glucose	8,54	Fusidic Acid	26,50
Glycerol	5,63	Rifamycin SV	78,84
L-Aspartic Acid	8,73	Guanidine HCl	23,54
D-Glucuronic Acid	8,80	Tetrazolium Violet	70,46
Citric Acid	9,09	Lithium Chloride	21,82
Alpha-Keto-Butyric Acid	7,27	Sodium Butyrate	56,86
Gentiobiose	32,54	pH 5	55,96
N-Acetyl-D-Glucosamine	83,81	8% NaCl	27,28
D-Fucose	7,56	D-Serine	99,96
D-Glucose-6-PO4	8,14	Minocycline	30,79
L-Glutamic Acid	8,10	Niaproof 4	17,42
Glucuronamide	6,65	Tetrazolium Blue	49,65
Alpha-Keto-Glutaric Acid	7,57	Potassium Tellurite	22,06
Acetoacetic Acid	16,27	Sodium Bromate	20,58

Table 17: Supplementary 1. Metabolism of strain *Lactobacillus heilongjiangensis*

Lactobacillus koreensis			
Negative Control	1,58	Sucrose	0,80
D-Raffinose	0,85	N-Acetyl-B-D-Mannosamine	0,75
Alpha-D-Glucose	22,16	L-Fucose	2,10
D-Sorbitol	1,47	D-Fructose-6-PO4	5,61
Gelatin	1,81	L-Histidine	1,96
Pectin	1,20	Mucic Acid	2,55
p-Hydroxy-phenylacetic acid	0,00	D-Malic Acid	1,45
Tween 40	4,56	Propionic Acid	1,61
Dextrin	7,83	D-Turanose	2,41
Alpha-D-Lactose	1,27	N-Acetyl-D-galactosamine	0,74
D-Mannose	0,27	L-Rhamnose	2,32
D-Mannitol	4,76	D-Aspartic Acid	2,91
Glycyl-L-Proline	1,00	L-Pyroglutamic Acid	1,54
D-Galacturonic Acid	2,45	Quinic Acid	2,57
Methyl pyruvate	18,17	L-Malic Acid	1,78
Gamma-Amino-Butryric Acid	1,00	Acetic Acid	1,47
D-Maltose	16,95	Stachyose	1,39
D-Melibiose	2,20	N-Acetyl Neuraminic Acid	0,75
D-Fructose	95,99	Inosine	34,97
D-Arabitol	1,45	D-Serine	2,63
L-Alanine	1,47	L-Serine	2,40
L-Galacturonic Acid Lactone	2,93	D-Saccharic Acid	2,59
D-Lactic Acid Methyl Ester	1,96	Bromo-Succinic Acid	0,86
Alpha-Hydroxy-Butyric Acid	2,45	Formic Acid	0,83
D-Trehalose	1,28	Positive Control	100,00
B-Methyl-D-Glucoside	1,00	1% NaCl	68,22
D-Galactose	8,61	1% Sodium Lactate	84,91
Myo-Inositol	1,51	Troleandomycin	15,25
L-Arginine	21,31	Lincomycin	13,02
D-Gluconic Acid	100,00	Vancomycin	86,07
L-Lactic Acid	3,58	Nalidixic Acid	84,80
Beta-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	1,78	Aztreonam	84,84
D-Cellobiose	8,44	pH 6	102,23
D-Salicin	0,91	4% NaCl	11,03
3-Methyl Glucose	3,08	Fusidic Acid	62,65
Glycerol	1,50	Rifamycin SV	83,47
L-Aspartic Acid	1,34	Guanidine HCl	10,07
D-Glucuronic Acid	2,71	Tetrazolium Violet	46,05
Citric Acid	2,82	Lithium Chloride	14,09
Alpha-Keto-Butyric Acid	8,67	Sodium Butyrate	72,19
Gentiobiose	1,02	pH 5	51,25
N-Acetyl-D-Glucosamine	17,54	8% NaCl	13,30
D-Fucose	2,35	D-Serine	28,64
D-Glucose-6-PO4	7,31	Minocycline	45,89
L-Glutamic Acid	1,22	Niaproof 4	10,54
Glucuronamide	3,18	Tetrazolium Blue	27,32
Alpha-Keto-Glutaric Acid	4,15	Potassium Tellurite	83,24
Acetoacetic Acid	3,10	Sodium Bromate	7,89

Table 18: Supplementary 2. Metabolism of strain *Lactobacillus koreensis*

Partie II

Diversité des levures dans les levains issus de fermentation naturelle en boulangerie française à faible intrant

Ce chapitre présente les résultats montrant la diversité des espèces de levures dans les levains et le rôle des pratiques socio-culturelles de 38 boulangers avec lesquels nous avons collaboré dans le but de mieux conserver cette diversité microbienne. Les pratiques des boulangers ont été recueillies par nos collaboratrices psychosociologues, Estelle Masson, Sandrine Bubbendorf et Léocadie Fayos. Pour décrire la diversité des espèces de levures, nous avons combiné une méthode culture-dépendante pour identifier les isolats des levains et une méthode culture-indépendante fondée sur le séquençage à haut-débit d'un marqueur de l'ADN des levains. Les pratiques des boulangers ont été regroupés en 2 groupes, ceux avec les pratiques paysannes utilisant des blés anciens, des meules de pierre, une longue fermentation et peu de panifications par semaine et ceux avec des pratiques artisanales qui utilisent des blés modernes, un pétrissage mécanique, des panifications intensives. Les levains hébergent une grande diversité d'espèces de levures comparés aux études précédentes. La fameuse levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* n'a été retrouvée dominante que dans 5/38 levains et a été concurrencée dans 6/38 levains. La distribution des espèces de levure dans les levains n'est pas reliée à la localisation géographique. Cependant, la pratique boulangère structure la distribution des espèces de levures. Les boulangers aux pratiques paysannes maintiennent une diversité d'espèce du genre *Kazachstania*, dont l'espèce *K. bulderi* et une espèce non encore décrite *Kazachstania sp.*. Les boulangers au pratiques artisanales conservent *Kazachstania humilis* et des espèces d'autres genres. Plus spécifiquement, la quantité de pain produite, l'origine du levain chef, l'âge du levain et la présence de levure au fournil pour la viennoiserie influence la diversité microbienne. Des pratiques plus spécifiques pourraient aussi être associés à la présence d'une espèce de levures dans les levains, comme l'addition de fruits, la formation de boulangers ou encore l'échange de semences entre paysans.

Classification

Major category: Microbiology

Minor category: Social Sciences, Psychological and Cognitive Sciences

Title : Human artisanal practices drive yeast species diversity in sourdough bread
Short title: Human as driver of yeast sourdough diversity

Authors

Elisa Michel[a,b], Estelle Masson[c], Sandrine Bubbendorf[d], Léocadie Fayos[c], Stéphane Guézenec[b], Judith Legrand[e], Olivier Rué[f], Valentin Loux[f], , Bernard Onno[a], Delphine Sicard[b] and 38 bakers*

Authors affiliation

[a] Oniris, Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, Rue de la Géraudière CS 82225, 44322 Nantes Cedex 3, France

[b] SPO, Inra, Univ. Montpellier, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

[c]Laboratoire de Psychologie: Cognition, Comportement, Communication – EA 1285, Université de Bretagne Occidentale, 20 rue Duquesne, CS 93837, F-29238 Brest 03, France

[d]I3 (UMR 9217), Telecom ParisTech.

[e]Génétique Quantitative et Evolution-Le Moulon, INRA, Université Paris-Sud, CNRS , AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France

[f]MaIAGE, INRA, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

*Bakers and farmers

Corresponding author Delphine Sicard, SPO, Inra, Univ. Montpellier, Montpellier SupAgro, Montpellier, France +33 4 99 61 24 60 delphine.sicard@inra.fr

Abstract

The domestication of plants and animals has been accompanied by the domestication of microbial species for processing fermented food. Even though the industrialization led to the selection and diffusion of specific fermenting strains, there are still ongoing artisanal processes that may allow the conservation of a higher microbial species diversity. Taking sourdough bread-making process as model system, we used an interdisciplinary participatory research approach including bakers, psycho-sociologists and microbiologists, to analyse French bread-making practices and to describe yeast species diversity in naturally fermented sourdough. The French bread-making practices were clustered in two groups, a farmer-baker-like practice group (using wheat landraces, millstone, long fermentation, extensive practise) and a baker-like practice group (using modern wheat varieties, mechanic kneading, intensive practices…). The sourdoughs host a peculiar and high yeast species diversity compared to what has been reported elsewhere. Unexpectedly, the most famous bakery yeast, *Saccharomyces cerevisiae* was dominant in only 14% of sourdoughs and were outcompeted in 16% of sourdoughs. The *Kazachstania* was the most represented genus. Bread-making practices drive the distribution of yeast species diversity. The farmer-baker group conserved a high number of *Kazachstania* the most frequent species, while the baker-like group maintained other species. Specific practices were found to be associated to peculiar yeast diversities, such as chief sourdough origin, the number of kg of bread per week, the use of commercial yeast, and the age of the sourdough. The addition of extra ingredient in sourdoughs, know-how sourdoughs or wheat seed exchanges could also have explained the occurrence of specific species. Overall, our results highlight the diversity of bakery's yeast species and the role of socio-cultural practices in conserving microbial biodiversity.

Keywords : Microbial community, *Kazachstania*, *Saccharomyces cerevisiae*, bread-making practices, Bread, Fermented food

Significance statement

Despite the cultural and historical importance of bread as food, the diversity of bread making processes and their associated microbial diversity has been poorly documented. Here, we reported the first joint analysis of cultural and yeast species diversity associated to sourdough

bread making. We reveal a diversity of bread-making practices clustered around two groups of practices related to the intensity of bread making. We show that the well-known bakery yeast S. cerevisiae is not the only dominant yeast species in naturally fermented sourdoughs. Other yeast species of the closely related Kazachstania clade are frequent. Their distribution and conservation are associated to different bread-making practices highlighting the role of man artisanal practices in conserving microbial species diversity.

Introduction

Domestication of species for food subsistence and human settlement has impacted ecosystems, species and genetic diversity in different ways. On one hand, through the intensification of agriculture, plants and animals' domestication have resulted in a loss of genetic and species diversity (Lacy, 1987). On the other hand, domestication also led to the emergence of new species and novel phenotypes (Harlan and de Wet, 1965). Indeed, domestication was accompanied by species adaptation to new anthropogenic environments leading to specialization and local adaptation within environments and divergence between environments. The transhumance and humans' travels around the world also made possible species dispersion and increased the distribution area of domesticated species. While the evolution of plants and animals domesticated species is well studied, the domestication of microbes remains poorly analyzed, notably due to challenges of analyzing microbial communities together with fermented food artisanal practices. They became aware of the function of microbial communities in the 19th century with Louis Pasteur's work: "the invisible became visible" (Pasteur, 1857). With the industrialization and the increase of knowledge in microbiology, domestication of microbial communities targeted species or even strain selection. This human selection led to a reduction of species and genetic diversity for making fermented food and limited the *in-situ* conservation of microbial communities. The domestication of the *S. cerevisiae* yeast species for the production of beer, wine, cheese, leavened bread or the one of the *Penicillium roquefortii* fungus species used to make cheese have been well studied (Hittinger et al., 2018; Monnet et al., 2015)(5,6). However, apart from few examples, the domestication of microbial species is poorly documented and focus on genetic diversity rather than species diversity.

Nowadays, bread is still a symbol deeply engrained to the history, religious rites and medicine of several cultures. The origin of bread has been recently 14 000 years ago dated back (Arranz-Otaegui et al., 2018). The bread history is intimately mixed with the one of wheat, the

evolution of tools, and the advent of Mediterranean civilizations (Samuel, 2002). The unleavened bread was often associated with religious rites while the fermented bread, the sourdough bread, was used as everyday food (Kwon and Tamang, 2015). The leavened bread was traditionally made with sourdough, flour, water and salt. The sourdough was generally initiated from a mixture of flour and water and naturally colonized by lactic acid bacteria and yeasts. Sourdough can be conserved from one bread making to the other or initiated again and again, depending on the craftsman. In 1867, yeast starters made of *Saccharomyces cerevisiae,* often called the « baker's yeast », were proposed as an alternative to sourdough to make bread. Nowadays, yeast starters are commonly used by local bakeries and industries to make bread. However, there is currently a new boom for artisanal bakery and for the use of naturally fermented sourdough to leaven bread.

In France, sourdough breads are made by professional bakers but also farmer-bakers that grow their own wheat, mill their seeds and make bread. Number of farmer-bakers increases since the 2000 with two motivating force: to grow wheat varieties meeting their need and to assert their independence towards industry (Demeulenaere et al., 2017). Although farmer-baker are less numerous than bakers, they participate to the revival of local wheat varieties and artisanal know-how, which may contribute to the preservation of socio-cultural and microbial diversities. In this study we used a participatory research approach involving psycho-sociologists, microbiologists, bio-mathematicians, bakers and farmer-bakers to study whether and how bakers and farmers-bakers contribute to the preservation of socio-cultural and yeast species diversity. This research emerged from a co-construction by bakers, farmer-bakers and academic researchers.

Results and discussion

1. Diversity of bread making practices

We worked with thirty-nine French bakers producing natural sourdough bread distributed all over France (Table 20). Their bread-making practices were analysed through personal interview (n=12), focus groups (n=3), observation during break-making workshops (n=2), and an online/phone survey (n=36). The general process of sourdough bread-making is presented on Figure 1. Sourdough is a naturally fermented mix of flour and water. During each bread-making process, the chief-sourdough is refreshed by addition of water and flour one or several times (a process called back-slopping), providing the final sourdough. The final sourdough is then mixed with flour, water and salt during kneading. After kneading, primary fermentation

occurs during the first rising. The dough is then divided and shaped. The pieces of dough are then left to rise during a second fermentation. They are finally baked in oven. For the next bread making practices, either a sample of the final sourdough or a sample of the dough taken after kneading is kept aside to make the chief (or mother) sourdough.

We analysed 29 variables around this general bread making process, describing variations at all steps of the bread-making process, from wheat seeds to baked bread (Figure 31, Figure 38). Four bakers did not answer the survey on bread-making practices, and four other bakers did not provide enough information about their practices and were excluded from the analysis. According to a hierarchical clustering, the 32 other bakers clustered into two groups according to their bread-making practices. The first group includes 6 bakers and 11 farmers-bakers having extensive practices: low bread production, use of ancient wheat varieties, manual kneading, working at ambient temperature, long fermentation time, no commercial baker's yeast. In addition, they tend to make their chief sourdough from dough after kneading. The second group is composed of 12 bakers and 4 farmer-bakers having more intensive practices, characterized by frequent bread-making, large bread production, mechanic kneading, the use of modern wheat varieties, cold, and yeast starters for pastries and buns. Finally, they tend to make their chief sourdough from final sourdough (Figure 32).

2. Culture and non culture-based analysis of fungi diversity

The yeast species diversity was analysed for 38 out of the 39 sourdoughs (Figure 33). The sourdough B14 was excluded for the microbial analyses, because of difficulties in isolating strains from the sample, suggesting that the sourdough microflora was not active anymore. The sourdough yeast density ranged from 5.56 log10 to 7.97 log10, with a mean value of 7.3 log10 CFU per gram of sourdough, as commonly found in sourdough from all over the world (Carbonetto et al., 2018; Clément et al., 2018a; De Vuyst et al., 2017, Urien et al., 2018). For each sourdough, species identification was performed by cultural and non-cultural method of ITS1 region. For yeast on isolation medium method, we isolated from 20 to 40 strains from each sourdough and identified the yeast species using ITS sequence polymorphism as well as other barcodes when needed (see M&M).

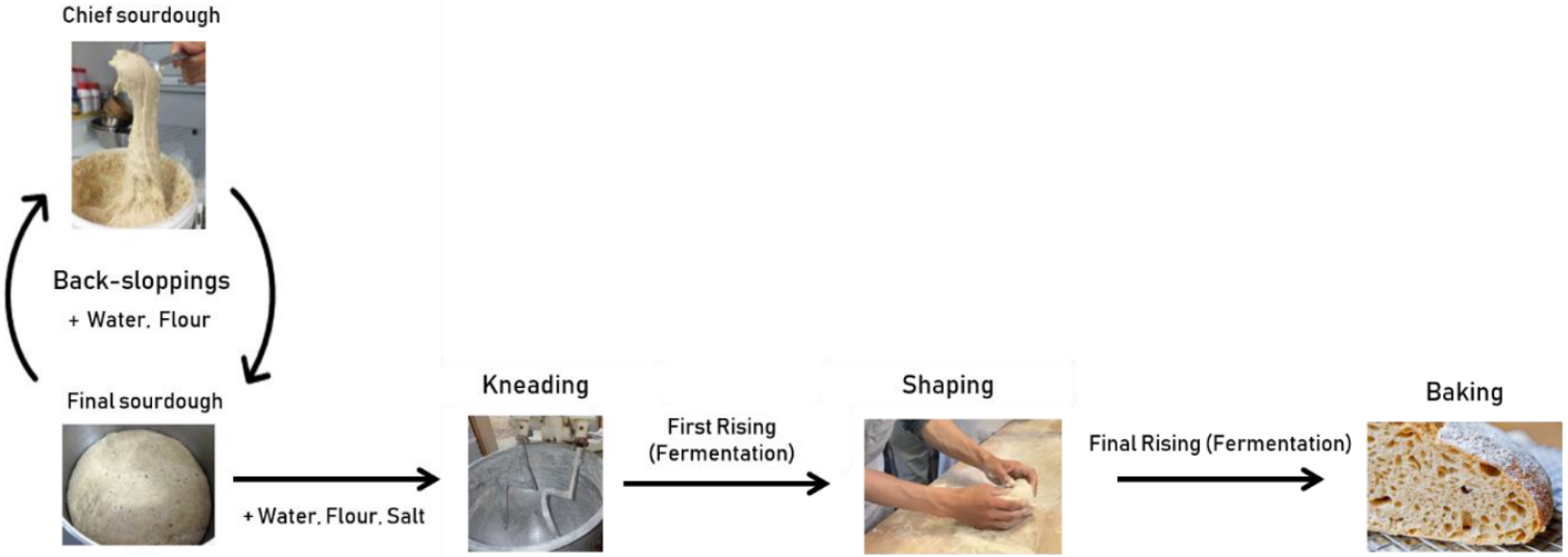


Figure 31. The bread-making process

The flour is obtained after the milling of the wheat, from ancient or modern varieties, on a millstone or a cylinder. The flour, mixed with water, permits the fermentation of the dough used a leavened agent, called the chief sourdough. With the back-sloppings allowing to refresh the chief sourdough, by addition of water and flour and a new fermentation, the baker constitutes the final leavened dough. This final fermented dough is added to the bread making recipe as the leaven, or in addition to the baker's yeast. After several fermentations, dough is baked in the oven to product bread.

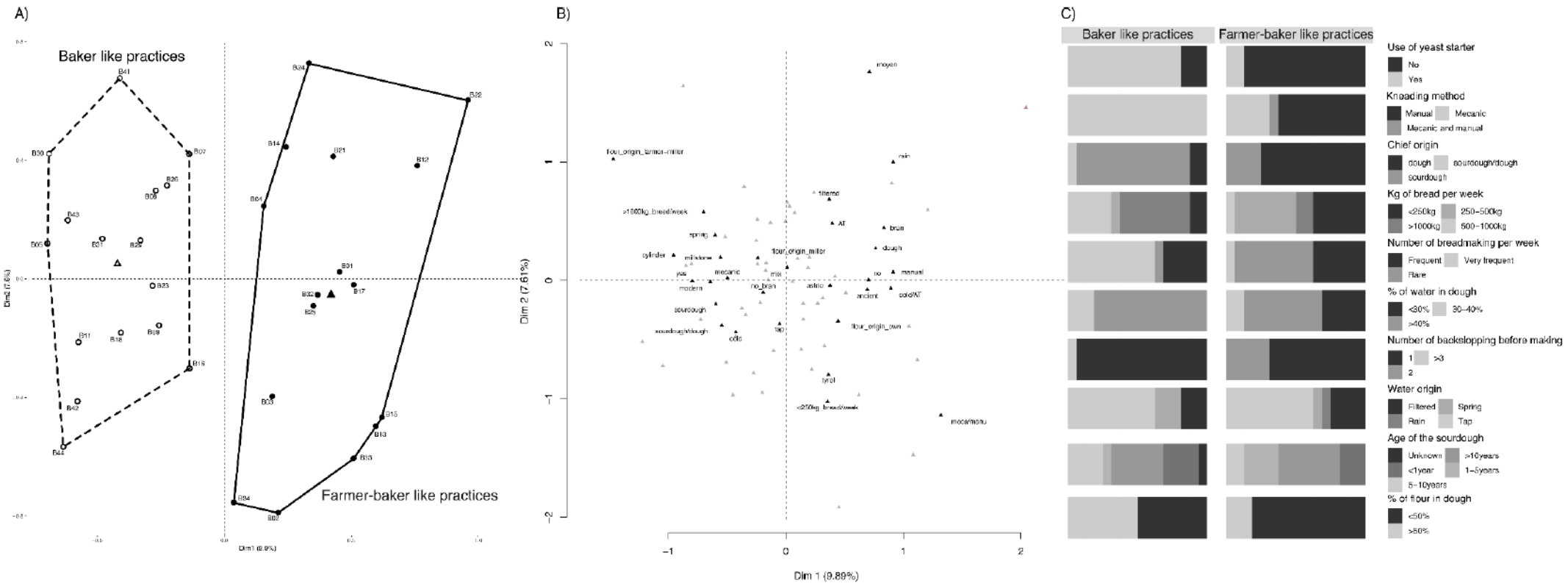


Figure 32. Multiple Correspondence Analysis (MCA)

A) Representation of bakers. Each point represents a baker. Left area brings together baker with baker like practices and right area bakers with farmer-baker like practices. Centroid of each group is designed by a triangle. B) Representation of the different variables of the MCA. C) Description for each practices groups of the variables: use of yeast starter, kneading method, chief origin, kg of bread produce per week, number of bread-making per week, percent of water in dough, number of back-sloppings before making bread, water origin, age of the sourdough and percent of flour in dough.

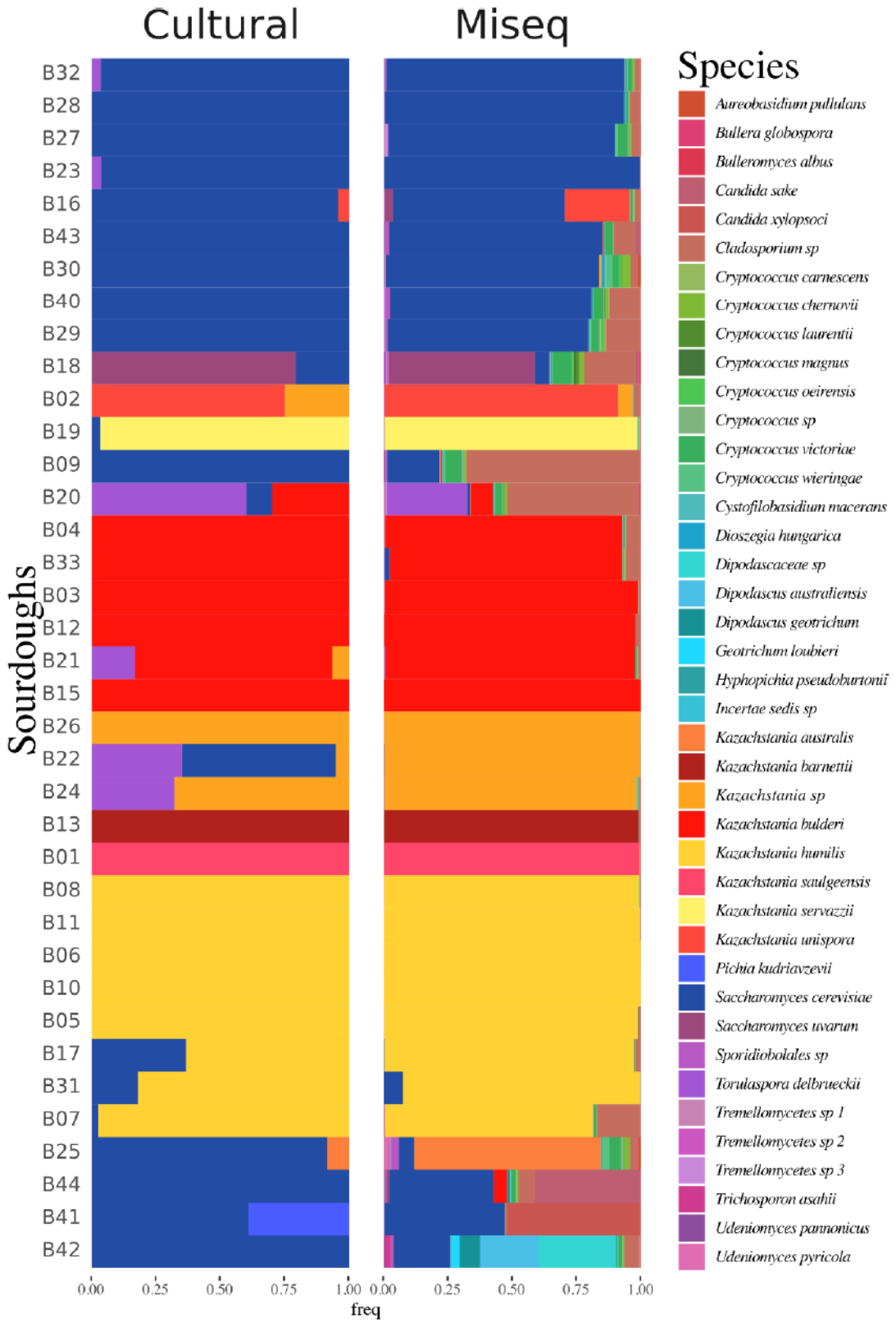


Figure 33. The yeast species diversity was analysed for 38 out of the 39 sourdoughs. Left: species were identified by traditional microbial isolation and identification using ITS sequencing. Right: species were identified by high throughput sequencing

A total of 1216 strains were characterized. For the culture-independent method, we developed an ITS1 meta-barcoding MiSeq sequencing method (see M&M). After filtering 5,360,620 raw ITS1 sequences for quality, abundance (>0.00005%) and chimera, 3,542,801 sequences were further analysed. The number of reads per sourdough ranged from 8421 to 194 557. Overall, the read sequences clustered in 113 OTUs. Among OTUs, 64 OTUs were identified as non-yeast, including 10 assigned to the order *Triticodae* (especially to the species *T. aestivum*), 50 assigned to plant pathogen fungi, like *Alernaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Gibberella*, etc, and 4 OTUs remained unidentified. Among the 40 OTU identified as yeasts or yeast-like, 96% were assigned to the phylum *Ascomycota*, 87.5% to the order *Saccharomycetales* and 85.7% were further assigned to the family *Saccharomycetaceae*. Only 4% of the total reads were assigned to the phylum Basidiomycota. Overall, 3 OTU assigned to the species *Kazachstania humilis*, *Kazachstania bulderi* and *Saccharomyces cerevisiae* represent 20.3%, 15.5% and 24.1% of the total reads respectively.

The barcode sequencing method allowed the detection of a higher number of species per sourdough (10 to 33 species) compared to the isolation based method (1 to 4 species). The two methods allow the identification of the same dominant species (freq>50%) in each sourdough except in 5 cases (B09, B20, B22, B25, B41). In two cases, the discrepancy was explained by the detection of *Cladosporium* sp. at high frequency with the barcode method while this species has not been isolated in our condition (Figure 3). In two other case, it was explained by a high number of *S. cerevisiae* isolated by cultivation contrary to what was observed using barcode sequenging. This could be related to laboratory contamination. Finally, in the last case, the species *Candida xylopsoci* was only detected by the barcoding based method while the *Pichia kudriavzevii* species was only identified by traditional cultivation. This was related to the similar ITS1 sequence between these two species. The correct species (*Pichia kudriavzevii*) could only be identified by analysing other barcodes on individual clones. Because cultural barcoding sequencing allows a deeper characterization of the fungi diversity, the distribution of yeast species diversity will be further described using metabarcoding data only.

3. Distribution of fungi species diversity

Within sourdough, the species richness ranged from 10 to 33, with a median of 23,5 (Table 21). All sourdoughs but two had a single dominant yeast species (frequency >0.5) and many less frequent species (Figure 33). The Shannon index ranged from 0.003 to 1.9 (Table 21). The between-sourdoughs species diversity was analysed using Unifrac distance. Unifrac

distances were computed from a phylogenetic tree built from the distances between OTUs using *Sporidiobolales species* as root (Figure 36). The impact of the chosen root on the phylogenetic tree and on the computed Unifrac distance was investigated (Figure 36). The Unifrac distances computed with four different rooted trees were highly positively correlated (Figure 36). The Unifrac distances between sourdoughs ranged from 0.0005 and 0.71. Overall, 40 yeast species were detected in the 38 sourdoughs, 12 were dominant (freq > 0.5) in at least one sourdough, 4 had a frequency between 0.20 and 0.50 and 24 had a frequency below 0.1. The dominant species were all fermentative species, except one Cladosporium sp. All the commonly encountered sourdough yeast genera (*Saccharomyces*, *Candida*, *Kazachstania*, *Pichia*, *Torulaspora* and *Hyphopichia)* in the literature, except the *Wickerhamomyces* genera, were found in France, showing that French bakers and farmer-bakers conserve a high yeast species diversity (Carbonetto et al., 2018).

4. The baker yeast, *Saccharomyces cerevisiae* is not the most common yeast species

The known bakery yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, was found as dominant species (freq>0.5) in only 9 out of 38 sourdoughs (24%) (Figure 33). In four cases, the *S. cerevisiae* species co-occurred at a frequency of 0.4 and 0.47 with *Candida sake* (Freq= 0.41) and *Pichia Kudriavzevii* (Freq=0.52) respectively. In the other cases, it had a frequency below 0.21. It was found at low frequency with other dominant yeast species, such as *Kazachstania australis*, *Kazachstania humilis*, *Saccharomyces uvarum* or *Torulsapora delbruecki* suggesting it can be outcompeted by other species in sourdough. Therefore, despite the recurrent use of *S. cerevisiae* as starter and despite its massive use in some bakeries and home, the species does not appear to have invade artisanal sourdoughs (Figure 33).

5. The *Kazachstania* genus is highly represented in sourdough

The *Kazachstania* genus was the most represented yeasts genus with six species found as dominant in sourdough, far from the *Saccharomyces* genus represented by only two species in sourdough (*S. uvarum* and *S. cerevisiae*) (Figure 33). *Kazachstania* species dominated in 20 sourdoughs (54%) while *Saccharomyces* species dominated in 10 sourdoughs (27%). The *K. humilis* species, followed by the *K. bulderi* species were the most common dominant species, respectively dominant in eight and six sourdoughs (Figure 33). The first species is common in sourdough and has been found in many countries, China, Ethiopia, Finland, Germany, Morocco, USA, Italy, Belgium and France (Clément et al., 2018b; De Vuyst et al., 2017;

Lhomme et al., 2014; Valmorri et al., 2010; Van Kerrebroeck et al., 2017; Wang et al., 2018). The second species has been described for the first time in anaerobic maize silage in the Netherlands and in fermented liquid feed for piglets (Gori et al., 2011; Middelhoven et al., 2000) and more recently in French wheat sourdoughs (Urien et al., 2018). A yet undescribed *Kazachstania* species was also identified in five sourdoughs all over France (dominant in three). Based on ITS and LSU (D1D2) barcodes, a very closed strain has been isolated from the boza, a Bulgarian fermented drink (Source: NCBI). In addition, *Kazachstania saulgeensis,* a recently discovered sourdough yeast species, was dominant in one sourdough. Finally, *Kazachstania australis, Kazachstania barnetti, Kazachstania unispora and K. servazzii* previously found in soil, in sauerkraut, in kefir, fermented milk and cheese, in soil respectively, were also detected once as dominant (Jacques et al., 2016; Kurtzman, 2003).

6. The bread-making practices drive part of the yeast species distribution

As presented in Figure 34, there was no evidence for geographic structuration of yeast species distribution. By contrast, bread making practise were associated with yeast species diversity. Unifrac distance clustered sourdoughs in three groups (Figure 35). Group 1 clustered sourdoughs having *Kazachstania* dominant species but K. servazzii and K. unispora. Group 2 contained sourdoughs with *Saccharomyces*, *K. servazzi* or *K. unispora* dominant species. Group 3 was composed of non-organic sourdoughs having *S. cerevisiae* together with other species such as *Pichia kudriavzevii*, *Candida sake*, or *Dipodascaceae sp*. Group1 sourdoughs were mostly made by bakers having farmer-like bread-making practice while group 2 and 3 sourdoughs were mostly made by bakers having baker like practice. Within group 1, the sourdoughs made with baker-like bread-making practice carried *K. humilis* as dominant species and in one case the yet undescribed *Kazachstania sp.* while the sourdoughs made with farmer-baker like practices, had *Kazachstania bulderi*, *K. australis*, *K. barnettii*, *K. saulgeensis* as well as the yet undescribed *Kazachstania* species.

We then studied whether Unifrac distances between communities were related to specific baker's practices. We first performed univariate MANOVA analysis on the 30 bakers which had less than 8 missing values among the 29 bread-making practices variables (Table 22). We then kept the nine practices variables having FDR adjusted p-values under 0.3, and test their effect in a multivariate MANOVA analysis including 29 bakers with no missing value (Table 22). The multivariate analysis revealed a significant effect (for a 5% level) of the chief

sourdough origin, the number of kg of bread per week and a broadly significant effect of the use of commercial yeast in the bakery and the age of the sourdough (Table 19, Figure 32).

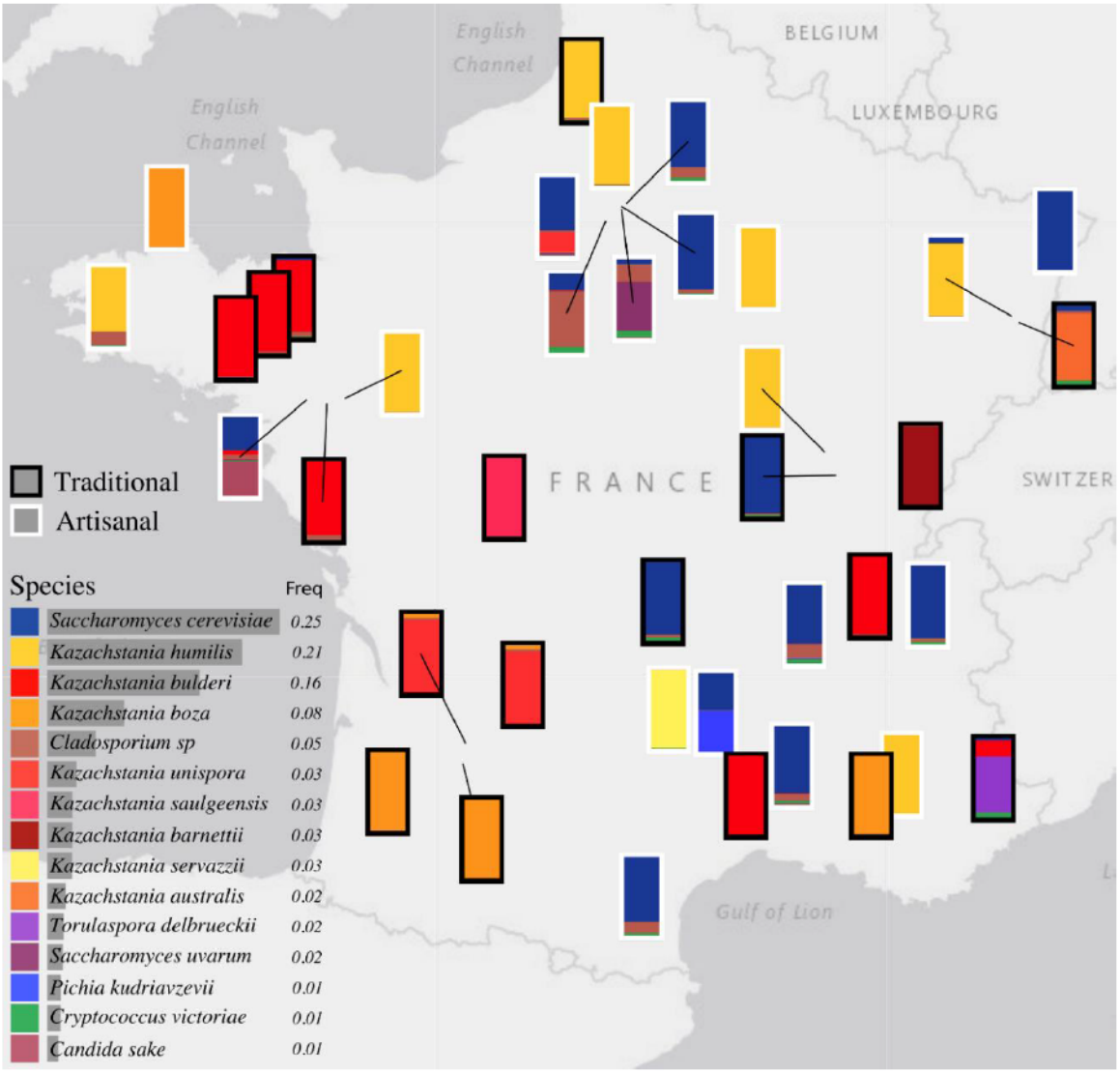


Figure 34. Yeast diversity across France.

Each bar represents the yeast diversity of one sourdough and is placed on the map where the baker is located.

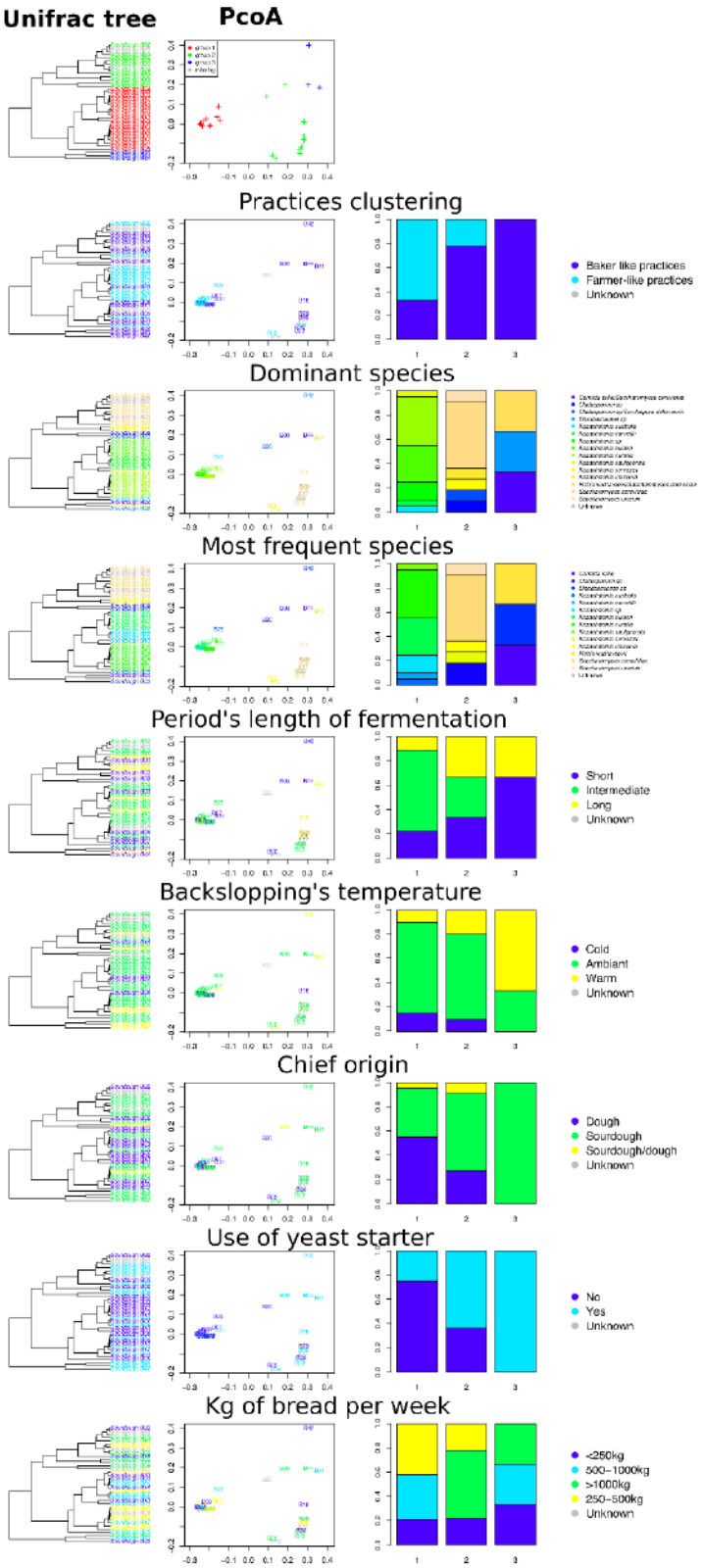


Figure 35. PCoA Analysis.

For each variable : at left, a tree constructed from Unifrac distance matrix colored by groups from PCoA analysis, PCoA graph colored by group in the center and at right the repartition of modalities of the variable among the three PCoA group.

	Df	Sum of Squares	Mean Squares	F. model	R2	Pr (>F)
Chief origin	2	0.45685	0.228423	6.0741	0.19591	0.00200 **
Yeast use bakery	1	0.12008	0.120083	3.1932	0.05150	0.06119 .
Kneading method	2	0.09103	0.045517	1.2104	0.03904	0.32194
Mill type	3	0.16814	0.056047	1.4904	0.7211	0.22276
Variety of cereals in dough	2	0.14683	0.73414	1.9522	0.06297	0.13497
Kg of bread per week	3	0.57836	0.192786	5.1265	0.24802	0.00240 **
Age sourdough	3	0.24868	0.082892	2.2042	0.10664	0.08678 .
Backslopping temperature	2	0.11790	0.058951	1.5676	0.5056	0.21116
Total fermentation period	2	0.10315	0.051577	1.3715	0.04424	0.37075
Residuals	8	0.30085	0.037606		0.12902	
Total	28	2.33187			1.00000	

Table 19. Multivariate manova analysis on the unifrac distances
Calculated on the 29 bakers with no missing values for the 9 bread-making practices retained variables (variables having a pvalue <0.3 in the univariate manova analysis after FDR correction)

Other bread-making practise than the one reported exhaustively could also explained the distribution of yeast species diversity. Discussions with the 5 bakers having the yet undescribed *Kazachstania* species suggested the role of the social network in the dispersion of this species in French sourdoughs. The bakers hosting this species have been connected over the years either through seeds exchanges, sourdoughs mixing or gift, bread-making common training or working in the bakery of other one. Our data suggest that each baker have maintained since the exchange(s) a favourable environment to maintain the species. The presence of other dominant species found in a single sourdough, can be linked to baker's practices. The species *Saccharomyces uvarum* has been described in the sourdough of the baker B18 as the only species. This species is known to ferment cider and white wines (Boynton and Greig, 2014; Hittinger et al., 2018), and is cryotolerant. Interestingly, baker 18 used an old apple to initiate his sourdough and prefer to work with low temperatures. The species *Candida sake* has been found in sourdough of the baker B44. It is the first description of this species in sourdoughs. It is used for sake and beer production. This baker maintains in parallel a rice sourdough and doesn't wash his hands from the rice sourdough to the wheat sourdough suggesting a direct link between practices and microbial diversity.

Conclusion et perspectives

In conclusion, a great diversity of yeast species was found in 40 French sourdoughs. This diversity was partly explained by a diversity of bread making practices. From the best of our knowledge, this is the first evidence of a relationship between microbial species diversity and social-cultural diversity in food. These findings could not have been detected without the participation of bakers and scientists, showing the interest of participatory research projects. Bakers using naturally fermented sourdoughs foster yeast diversity maintenance despite the massive selection of *S. cerevisiae* to ferment food, including bread. Agriculture and socio-ecological practices became a dominant evolutionary force that drives evolution (Turcotte et al., 2017).

Materials and methods

a. A questionnaire survey, face to face interviews and focus-groups to collect bread-making practices

The materials were collected among bakers and farmer-bakers through a questionnaire survey. The questions considered are: *i)* their agricultural activity: the wheat type and wheat varieties (ancient, modern), whether they have their own flour cultivation, or from an external or personal mill, the water origin and if they consider themselves as artisans-bakers or farmer-bakers. *ii)* their sourdoughs: the age of the sourdough, its hydration, its starter (dough, sourdough), the number of back-sloppings before bread making and per week, the temperature of water used for back-sloppings. *iii)* their bread-making process: the number of bread making per week, the percentage of sourdough in bread dough, the percentage of flour in bread dough, the percentage of salt in bread dough, the kneading methods, the total period of fermentation and the addition of baker's yeast in dough. In parallel, interviews and focus groups were realized with bakers and farmers-bakers for a more holistic approach of their practices in particular to collect data on the interpersonal networks of knowledge between bakers, their participation in trainings and their practices of gifts, exchange or mixture of sourdoughs. The interviews were entirely transcribed and coded by means of the software HyperResearch to realize a thematic analysis of contents (Hesse-Biber et al., 1991).

b. Sourdoughs samples, strain isolation, enumeration

The collection date of each sourdough is indicated in Table 20. Those sourdoughs were collected before kneading and are called final sourdoughs. They were sent the day of collection

to the lab where yeast and bacteria were isolated, and sourdough stored at -20°C in sterile vials. Enumeration and strain isolation for each sourdough sample were made as in (Urien, 2015). Ethic and rights associated to sourdough collection and strains isolation have been respected.

b. Species identification

The Internal transcribed spacer 1 (ITS1) ribosomal DNA of each 1216 yeast isolates was amplified by PCR from chromosomal DNA, either by using primers ITS1F and ITS2 (White et al., 1990), or primers NSA3 and 58A2R (Martin and Rygiewicz, 2005, Urien et al.,2018). For isolates unidentified with the ITS1 region alone, DNA was extracted according to MasterPure Yeast DNA purification kit (Epicentre, Epibio). PCR reactions targeting partial genes, the D1D2 region of the large subunit of rRNA (LSU), a part of the RNA polymerase II large subunit encoding gene (*RPB1)*, a part of the RNA polymerase II encoding gene (*RPB2)*, a part of the Actin encoding gene *Act1* and transcriptional Elongation Factor TEF were performed. To discriminate three specific isolates, PCR on genes *GHD1*, *FSY1*, *URA3*, *DRC1*, *MET2* were performed (Peris et al., 2014). All PCR products were sent to be sequenced with Sanger sequencing (Eurofins, Germany). Each primer used figured in Table 23. Species were identified using NCBI (2013), YeastIP (Weiss et al., 2013) and a personal database, that was constructed after *ITS1*, *RPB2*, LSU sequencing of all 33-yeast species found in the literature in sourdoughs (Carbonetto et al., 2018).

c. Sourdough DNA extraction, MiSeq sequencing, bioinformatics and statistics analyses

The ITS1 region was targeted with the PCR primers ITS1-F (5′-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA - 3′) and ITS2 (5’-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3’). Amplicon libraries were constructed as previously described in Michel *et al.* 2016 and Barret *et al.* 2015 (Barret et al., 2015a; Michel et al., 2016). The sequencing run was performed with MiSeq Reagent Kit v3. Sequences were analysed through FROGS “Find Rapidly OTU with Galaxy Solution” (Escudie et al., 2015) and home-made pipelines. Overlapped reads were merged with Flash (Magoč and Salzberg, 2011), with a minimum overlap of 10 nucleotides, a maximum overlap of 300 nucleotides and a maximum mismatch density of 0.1. Adapters were removed with Cutadapt (Martin, 2011) and data were cleaned with Sickle (Core, 2015). A control of sequence quality with Fastq was realized after each step. Reads were clustered with Swarm (Mahé et al., 2014) and chimeras deleted with VSEARCH (Rognes et al., 2016). Sequences were then filtered on abundance (minimum 0.00005). From the OTU’s abundance table and for each OTU, the taxonomic affiliation using UNITE (Kõljalg et al., 2005), YeastIP

(Weiss et al., 2013) and own databases was obtained. The analysis of microbial communities from cultural microbiology and high-throughput sequencing, multivariate statistics and graphics were conducted by using the packages Phyloseq, ggplot2, FactoMineR , ggmap through R (Kahle and Wickham, 2013; Lê et al., 2008; McMurdie and Holmes, 2013a; Wickham, 2016). Multiple correspondence analysis and univariate MANOVA analysis were performed on bread-making practices. Phylogenetic sequences were aligned with Clustalo The phylogenetic tree was constructed with parsimony algorithm, included the calculi of 100 replicates bootstraps, pairwise ktuple-distances with Seaview (Gouy et al., 2009). From abundance table, diversity indexes (Shannon, Chao1) and Unifrac distance matrix were calculated. Unifrac distances were computed from rooted phylogenetic trees built from the distances between OTU. The PERMANOVA analyses were based on the Unifrac distances. We have seen that the OTU tree which have been used to compute the Unifrac distances built from these distances does not fit correctly the phylogeny and notably, some *Ascomycota* are misclassified among the *Basidiomycota*. To check the sensitivity of our analysis to this misclassification, we performed the same analyses without the sourdoughs which had one misclassified species representing more than 10% of their reads. We took out of the analysis the following sourdough: Sourdough B20, Sourdough B41, Sourdough B42, Sourdough B44. We found similar results, with chief origin and kg bread week the significant variables.

d. Physico-chemicals analyses

As in Michel *et al.*, 2016 (Michel et al., 2016), pH and Total Titrable Acidity of the sourdough samples were analyzed in triplicate with an automatic titrator using a 10-mL volume and N/10 NaOH solution concentration (pH-Matic 23, Grosseron, Saint-Herblain, France). The results of the TTA assay were expressed in volume of 0.1 M NaOH (sodium hydroxide) used to neutralize a 10 g sample (Romanian Standard Methods 90/2007). Organic acids were analyzed by liquid chromatography using an HPLC system, expressed as g/kg of sourdough and bread.

Acknowledgements

This publication has emanated from research conducted with the financial support of French National Research Agency, ANR-13-ALID-0005. We thank all the bakers and farmers-bakers for the share of their sourdoughs and for the time we spent to exchange knowledge. We thank Yoann Robert, Candice Aulard, Josette Bessière for lab assistance and Matthieu Barret for MiSeq sequencing.

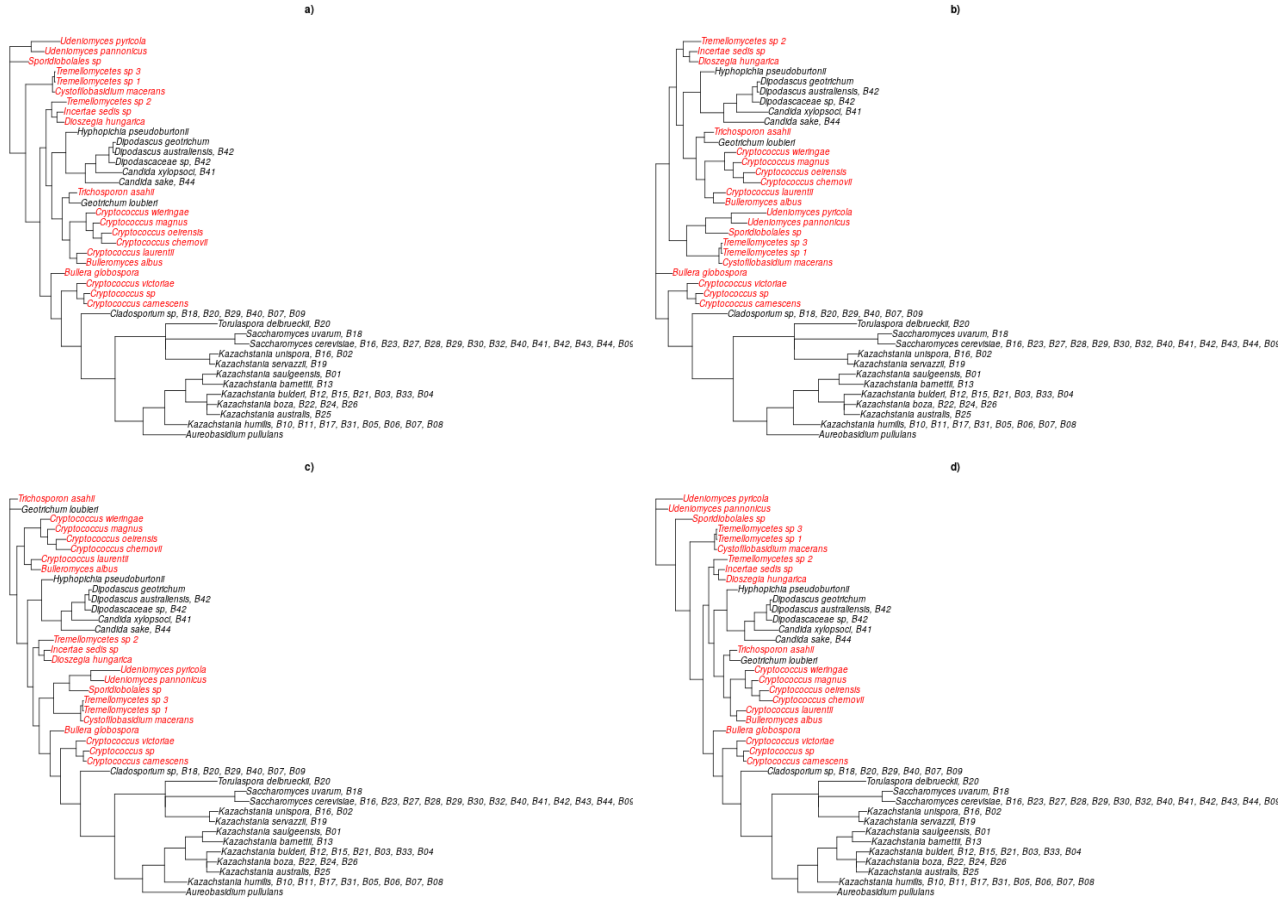


Figure 36. Figure S1 : Rooted trees on four different OTU identified as : a) *Sporidiobolales species*, b) *Bullera globospora*, c) *Trichosporon asahii*, d) *Udeniomyces pyricola*.
Species name are colored according to their family. Bakers code are shown in front of each species when its frequency was over 10 % in the sourdough.

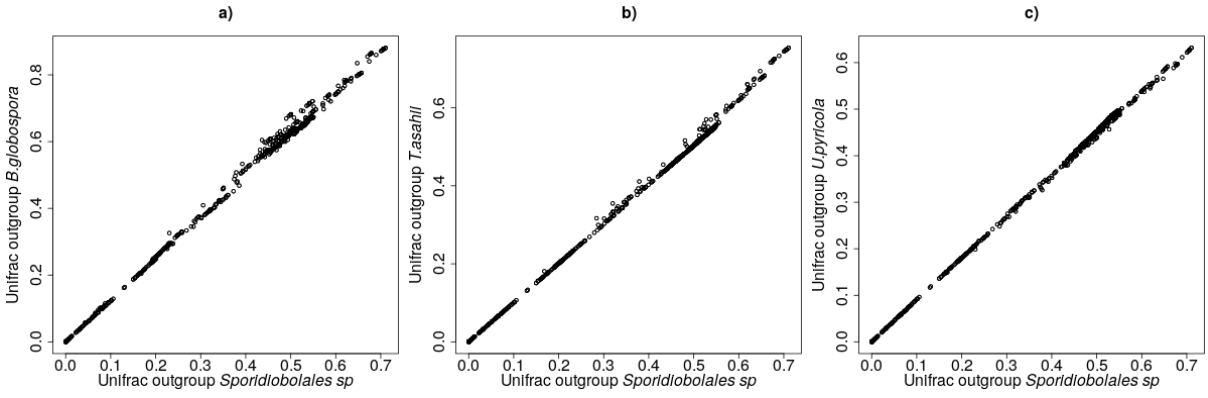


Figure 37. Figure S2. Unifrac distances computed with rooted trees on four different species. On the x-axis the Unifrac distance computed with the tree rooted on *Sporidiobolales species. On the y-axis,* Unifrac distance computed with the tree rooted on : a) *Bullera globospora*, b) *Trichosporon asahii*, c) *Udeniomyces pyricola*.

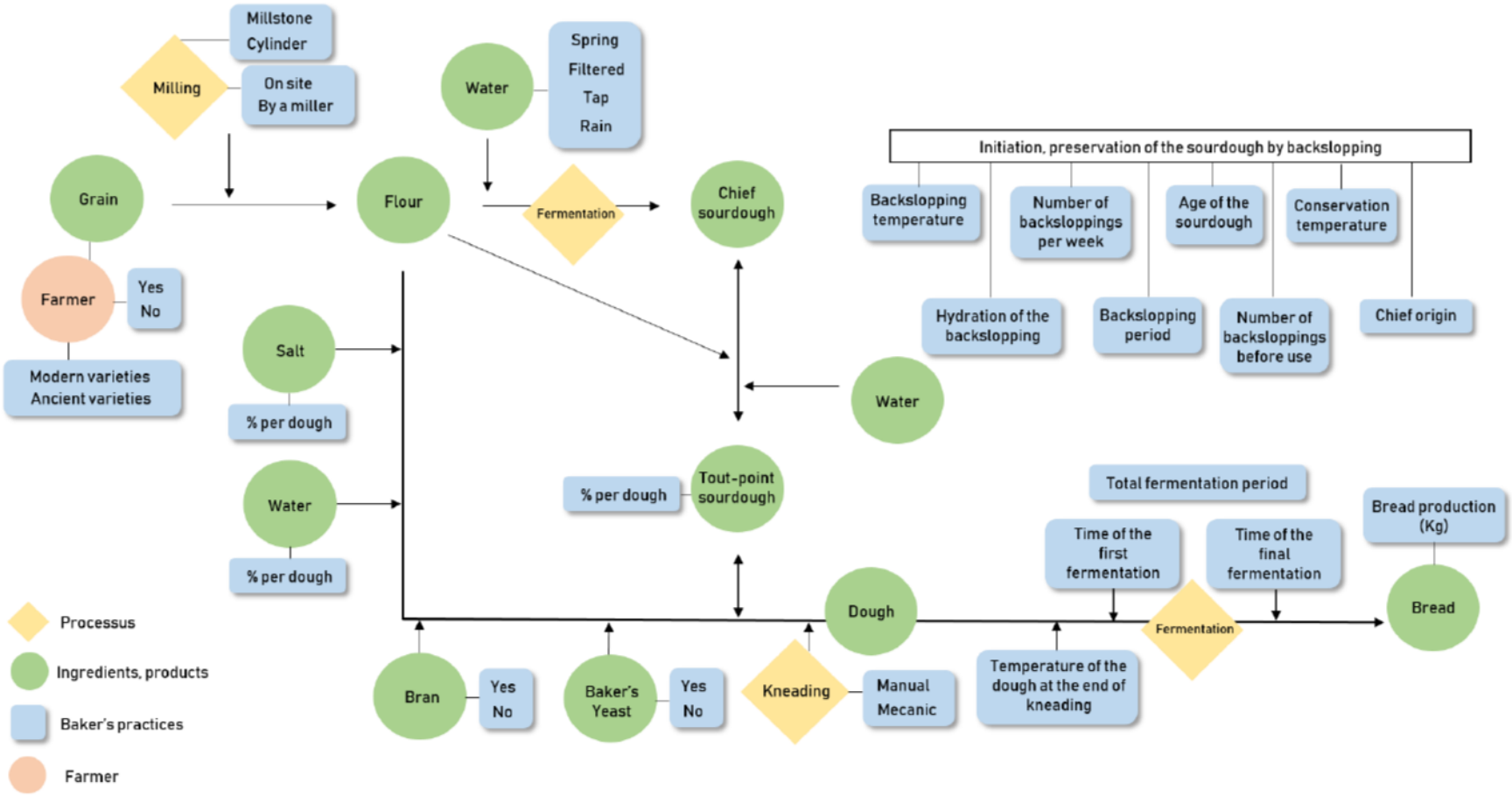


Figure 38. Figure S3. All steps of the bread-making process asked to the bakers, from wheat seeds to baked bread

Bakers (code)	French departement	Region	Practices	Organic process	Collection date	References of published articles with bakers
B01	Vienne	Nouvelle-Aquitaine	Farmer baker	Yes	Nov. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B02	Lot-et-Garonne	Nouvelle-Aquitaine	Farmer baker	Yes	Dec. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B03	Isère	Auvergne-Rhône-Alpes	Farmer baker	Yes	Dec. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B04	Loire-Atlantique	Pays-de-la-Loire	Artisan baker	Yes	Jan. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B05	Oise	Hauts-de-France	Artisan baker	Yes	Jan. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B06	Aube	Grand-Est	Artisan baker	Yes	Mar. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B07	Finistère	Bretagne	Artisan baker	Yes	Mar. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B08	Loire-Atlantique	Pays-de-la-Loire	Artisan baker	Yes	Mar. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B09	Essonne	Ile-de-France	Farmer baker	Yes	Apr. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B10	Alpes-de-Haute-Provence	Provence-Alpes-Côte-d'Azur	Artisan baker	Yes	Apr. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B11	Saône-et-Loire	Bourgogne-Franche-Comte	Artisan baker	Yes	Apr. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B12	Ille-et-Vilaine	Bretagne	Farmer baker	Yes	Apr. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B13	Doubs	Bourgogne-Franche-Comte	Artisan baker	Yes	Apr. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B14	Haut-Rhin	Grand-Est	Artisan baker	Yes	Apr. 2013	Lhomme et al., 2016; Urien et al., 2018
B15	Hérault	Occitanie	Farmer baker	Yes	Jan. 2015	Michel et al., 2016
B16	Yvelines	Ile-de-France	Farmer baker	Yes	Jan. 2015	Michel et al., 2016
B17	Somme	Hauts-de-France	Artisan baker	Yes	Jan. 2015	Michel et al., 2016
B18	Paris	Ile-de-France	Artisan baker	Yes	Jan. 2015	Michel et al., 2016
B19	Aveyron	Occitanie	Artisan baker	Yes	Feb. 2015	Michel et al., 2016
B20	Alpes-Maritimes	Provence-Alpes-Côte-d'Azur	Farmer baker	Yes	Feb. 2015	Michel et al., 2016
B21	Morbihan	Bretagne	Farmer baker	Yes	Feb. 2015	Michel et al., 2016
B22	Lot-et-Garonne	Nouvelle-Aquitaine	Farmer baker	Yes	Feb. 2015	Michel et al., 2016
B23	Bas-Rhin	Grand-Est	Artisan baker	Yes	Apr. 2015	Michel et al., 2016
B24	Vaucluse	Provence-Alpes-Côte-d'Azur	Farmer baker	Yes	Feb. 2015	Michel et al., 2016
B25	Haut-Rhin	Grand-Est	Farmer baker	Yes	Mar. 2015	Michel et al., 2016
B26	Côtes-d'Armor	Bretagne	Artisan baker	Yes	Mar. 2015	Michel et al., 2016
B27	Puy-de-Dôme	Auvergne-Rhône-Alpes	Farmer baker	Yes	Mar. 2015	Michel et al., 2016
B28	Paris	Ile-de-France	Artisan baker	Yes	Mar. 2015	Michel et al., 2016
B29	Aude	Occitanie	Farmer baker	Yes	Apr. 2015	Michel et al., 2016
B30	Savoie	Auvergne-Rhône-Alpes	Artisan baker	Yes	Apr. 2015	Michel et al., 2016
B31	Haut-Rhin	Grand-Est	Artisan baker	Yes	Apr. 2015	
B32	Saône-et-Loire	Bourgogne-Franche-Comte	Artisan baker	Yes	Mar. 2015	
B33	Ille et Vilaine	Bretagne	Farmer baker	Yes	Feb. 2016	
B34	Hérault	Occitanie	Farmer baker	Yes	Oct. 2017	
B40	Paris	Ile-de-France	Artisan baker	No	May 2015	
B41	Lozère	Occitanie	Artisan baker	No	Jun. 2015	
B42	Loire	Auvergne-Rhône-Alpes	Farmer baker	No	Jul. 2015	
B43	Gard	Occitanie	Artisan baker	No	Jul. 2015	
B44	Loire-Atlantique	Pays-de-la-Loire	Artisan baker	No	Mar. 2016	

Table 20. Table S1. Code of each baker, location (French department, Region), practices (Baker / Farmer-baker), organic process (yes/no), collection date of sourdoughs and references

	Observed	Chao1	SE (Chao1)	Shannon
Sourdough_B01	24	27	4,16	0,05
Sourdough_B10	15	18	3,41	0,00
Sourdough_B11	15	16.5	2,57	0,03
Sourdough_B12	23	68	30,18	0,12
Sourdough_B13	23	23	0,16	0,07
Sourdough_B14	26	26	0,25	1,24
Sourdough_B15	19	21	2,87	0,01
Sourdough_B16	18	18	0,49	0,95
Sourdough_B17	22	27	5,52	0,17
Sourdough_B18	23	24	2,31	1,49
Sourdough_B19	23	38	13,71	0,12
Sourdough_B02	20	20	0,49	0,41
Sourdough_B20	25	25.5	1,29	1,34
Sourdough_B21	21	22	1,81	0,19
Sourdough_B22	10	13	4,13	0,04
Sourdough_B23	22	23.4	1,93	0,05
Sourdough_B24	21	24	4,57	0,14
Sourdough_B25	24	24	0,49	1,25
Sourdough_B26	19	19.75	1,42	0,03
Sourdough_B27	22	22.5	1,29	0,60
Sourdough_B28	26	27.2	1,84	0,36
Sourdough_B29	21	21	0,16	0,86
Sourdough_B03	28	33	5,52	0,11
Sourdough_B30	21	21	0,00	0,86
Sourdough_B31	22	23.5	2,58	0,31
Sourdough_B32	25	26	2,31	0,43
Sourdough_B33	31	34	4,60	0,46
Sourdough_B04	27	30	4,16	0,36
Sourdough_B40	28	31	4,16	0,86
Sourdough_B41	27	28	1,81	0,76
Sourdough_B42	29	29	0,49	1,91
Sourdough_B43	29	29	0,00	0,76
Sourdough_B44	33	34.5	2,59	1,40
Sourdough_B05	24	25.5	2,58	0,09
Sourdough_B06	26	33.5	8,13	0,01
Sourdough_B07	28	28.6	1,18	0,61

Table 21. Table S2. Alpha diversity indexes, number of species observed, Chao1, SE-Chao1 Shannon indexes

var	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)	nb	p.adj
type_baker	1	0.11146397	0.11146397	1.2842982	0.04385621	0.22995401	30	0.42924748
milling	1	0.18172046	0.18172046	2.1561357	0.07149907	0.10857828	30	0.26501366
bran	1	0.05228220	0.05228220	0.5880786	0.02057076	0.52029594	30	0.60981137
conservation_temperature_sourdough	3	0.31634931	0.10544977	1.2320954	0.12446965	0.25514897	30	0.44651070
chief_origin	2	0.52801135	0.26400568	3.5400634	0.20774942	0.00959808	30	0.07950410
water_origin	4	0.50584788	0.12646197	1.5530297	0.19902907	0.12937413	30	0.27865196
flour_origin	2	0.15260392	0.07630196	0.8623588	0.06004298	0.47730454	30	0.60981137
yeast_use_bakery	1	0.47466094	0.47466094	6.4301114	0.18675837	0.00419916	30	0.07838432
kneading_method	2	0.39083788	0.19541894	2.4532539	0.15377765	0.03879224	30	0.16866627
mill_type	3	0.48833405	0.16277802	2.0612400	0.19213814	0.06278744	30	0.19533871
variety_cereals_dough	2	0.41346676	0.20673338	2.6228899	0.16268113	0.04779044	30	0.16866627
kg_bread_week	3	0.65417667	0.21805889	3.0038823	0.25738997	0.01419716	30	0.07950410
age_sourdough_collection	2	0.16280826	0.08140413	0.9081458	0.06529597	0.44091182	29	0.60981137
age_sourdough_year	3	0.68837029	0.22945676	3.4903764	0.29520146	0.00559888	29	0.07838432
hydratation_backslopping	2	0.11542612	0.05771306	0.6546747	0.04976746	0.60867826	28	0.68171966
backslopping_temperature	2	0.41421780	0.20710890	2.6285819	0.16297663	0.01299740	30	0.07950410
backslopping_period	2	0.07051819	0.03525910	0.4285587	0.03314822	0.80483903	28	0.80483903
temperature_dough_end_kneading	2	0.13200763	0.06600382	0.7655112	0.06241169	0.52269546	26	0.60981137
sourdough_weight_dough	2	0.09791642	0.04895821	0.5409390	0.03852584	0.74385123	30	0.77140128
flour_weight_dough	1	0.12728051	0.12728051	1.4761455	0.05007932	0.20295941	30	0.40591882
water_weight_dough	2	0.33853022	0.16926511	2.0744707	0.13319687	0.08058388	30	0.22563487
salt_weight_dough	1	0.03529227	0.03529227	0.3973990	0.01450499	0.74265147	29	0.77140128
total_fermentation_period	2	0.40244345	0.20122173	2.5398060	0.15834394	0.04819036	30	0.16866627
first_fermentation	1	0.06491208	0.06491208	0.7242651	0.02612387	0.48770246	29	0.60981137
final_fermentation	1	0.17644496	0.17644496	2.0638311	0.07101029	0.11357728	29	0.26501366
nb_backslopping_week	1	0.08931733	0.08931733	1.0198285	0.03514247	0.38892222	30	0.60499011
nb_backslopping_before_use	2	0.17860310	0.08930155	1.0203841	0.07027253	0.34913017	30	0.57503793
nb_breadmaking_week	2	0.14641928	0.07320964	0.8252732	0.05760960	0.49150170	30	0.60981137

Table 22. Table S3. Univariate permutational Manova analysis performed on the Unifrac distance between the sourdoughs of 30 bakers which had less than 8 missing values among the 29 practices variables.

Bakers 6, 10, 19 et 20 were excluded as they had more than 8 missing values.

Region amplification	Primers	Sequence	Reference
ITS (ITS1- 5.8S - ITS2)	ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	White *et al.,* 1990
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
	NSA3	5'- AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA-3'	Martin et Rygiewicz, 2005
	NLB4	5'- GGATTCTCACCCTCTATGAC-3'	
ITS1	NSA3	5'- AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA-3'	Martin et Rygiewicz, 2005
	58A2R	5'- CTGCGTTCTTCATCGAT -3'	
	ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	White *et al.*, 1990
	ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	Buée *et al.*, 2009
LSU (D1D2)	NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	O'Donnell *et al.*, 1993
	NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	
RPB1	RPB1-Af	5'-GARTGYCCDGGDCAYTTYGG-3'	Matheny *et al.*, 2002
	RPB1-Cr	5'-CCNGCDATNTCRTTRTCCATRTA-3'	
RPB2	RPB2-5F	5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3'	Liu *et al.*, 1999
	RPB2-7cR	5'-CCCATRGCTTGYTTRCCCAT-3'	
LSU	LSU-LROR	5'- ACCCGCTGAACTTAAGC-3'	Vilgalys and Hester, 1990
	LSU-LR5	5'- TCCTGAGGGAAACTTCG-3'	
Act1	CA5R	5'-GTGAACAATGGATGGACCAGATTCGTCG-3'	Kan *et al.*, 1993
	CA14	5'-AACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGC-3'	
TEF	YTEF-1G	5'-GGTAAGGGTTCTTTCAAGTACGCTTGGG-3'	Kurtzman and Robnett, 2003
	YTEF-6G	5'-CGTTCTTGGAGTCACCACAGACGTTACCTC-3'	
GDH1	GDH1-F	5'- TGGAAATGAGCGGAAGAAGAAAGC-3'	Peris *et al.*, 2014
	GDH1-R	5'- CTGTAGGCACCGAACAAGTAACC-3'	Nguyen and Gaillardin, 2005
FSY1	FSY1-F	5'- GGATCYTCRACAAGCGTTTCTC-3'	Libkind, Hittinger *et al.*, 2011
	FSY1-R	5'- AAGGCAAACAYGTAAAGCAAAG-3'	
URA3	URA3-F	5'- GCGCCCCTTTCTCTTATGTT-3'	Peris *et al.*, 2014
	URA3-R	5'- CATTTGCTTTTGTTCCACCA-3'	
DRC1	DRC1-F	5'- GCAATTAAGGGAGGCAATAAAAGTC-3'	Peris *et al.*, 2014
	DRC1-R	5'- CAACACAAGGGCACTCATAATC-3'	
MET2	MET2-F	5'- CGAAAACGCTCCAAGAGCTGG-3'	Sampaio and Gonçalves, 2008
	MET2-R	5'- GACCACGATATGCACCAGGCAG-3'	

Table 23. Table S4. Oligonucleotides primers used for PCR amplification and sequencing

Taxonomy	B01	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B02	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27
Ascomycota;Dothideomycetes;Dothideales;Dothioraceae;Aureobasidium;Aureobasidium_pullulans	19	0	0	22	4	32	4	22	3	36	31	81	40	43	1	2	29	511	0	72
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Bullera;Bullera_globospora	4	1	3	3	5	30	0	0	13	35	3	12	55	7	0	0	0	123	0	28
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Bulleromyces;Bulleromyces_albus	9	0	1	4	2	6	0	0	0	8	0	31	9	0	0	0	30	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_humil	33	104676	93144	12	18	31	31	0	36944	9	1	59	3	1	0	2	0	1	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Candida;Candida_sake	1	0	10	0	3	4	0	0	0	101	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Candida;Candida_xylopsoci	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ascomycota;Dothideomycetes;Capnodiales;Cladosporiaceae;Cladosporium-;Cladosporium_sp	430	5	330	1249	738	1790	5	704	812	1768	152	1259	6381	416	15	62	408	1108	48	561
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_carnescens	5	0	1	1	0	3	0	14	2	0	14	0	12	66	1	1	5	15	1	25
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_chernovii	14	1	0	5	9	9	2	75	54	190	18	0	162	32	0	6	69	838	9	129
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_laurentii	2	0	0	0	3	3	0	1	17	92	1	5	6	17	0	0	0	4	20	7
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_magnus	0	0	0	1	0	12	3	0	0	85	11	0	21	8	0	0	44	32	2	5
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_oeirensis	4	0	0	0	3	22	5	21	9	72	35	9	38	2	8	0	201	237	39	23
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_sp	14	0	8	1	9	67	2	56	15	0	53	11	32	64	0	6	13	342	13	91
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_victoriae	56	2	10	47	94	259	9	216	129	632	133	69	328	241	5	21	160	1771	46	711
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_wieringae	9	1	0	19	13	46	6	43	0	51	61	72	39	15	1	2	95	1063	1	111
Basidiomycota;Tremellomycetes;Cystofilobasidiales;Cystofilobasidiaceae;Cystofilobasidium;Cystofilobasi	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	4	0	0	0	0	83	2	1
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Dioszegia;Dioszegia_hungarica	0	0	0	8	9	15	8	0	11	38	4	35	43	8	0	1	0	166	4	31
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Dipodascaceae;unidentified;Dipodascaceae_sp	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	3	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Dipodascaceae;Dipodascus;Dipodascus_australiensis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Dipodascaceae;Dipodascus;Dipodascus_geotrichum	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	36	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Dipodascaceae;Geotrichum;Geotrichum_loubieri	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Pichiaceae;Hyphopichia;Hyphopichia_pseudoburtonii	0	0	3	0	17	14	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	40	3	2	0
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Incertae_sedis;unidentified;Incertae_sedis_sp	4	0	0	1	4	11	1	44	1	0	1	0	14	0	0	0	0	14	0	19
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_austra	0	0	0	0	0	0	0	3	1	10	0	0	0	0	0	0	1	29220	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_barne	0	4	9	8	92523	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2539	1	0	8374	0	61508	0	59181	1
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_bulde	59	5	14	62838	13	8	148592	3	1	0	1	8	1104	37320	0	2	0	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_serva	0	4	0	0	0	0	0	47	1	1	33320	0	2	1	0	4	0	0	0	2
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_saulg	114296	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_unisp	17	2	0	0	0	0	0	7051	0	1	0	42916	0	0	0	0	0	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Saccharomyces;Saccharomyces_ce	4	2	5	1	0	0	0	18689	35	512	6	1	145	11	2	21816	17	2407	1	15902
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Saccharomyces;Saccharomyces_uv	0	0	0	0	0	0	0	925	0	5000	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
Basidiomycota;Microbotryomycetes;Sporidiobolales;unidentified;unidentified;Sporidiobolales_sp	13	2	0	16	24	23	14	49	18	63	30	53	1	64	0	6	61	1162	7	58
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Torulaspora;Torulaspora_delbrue	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3914	75	13	7	44	0	0	0
Basidiomycota;Tremellomycetes;unidentified;unidentified;unidentified;Tremellomycetes_sp_1	1	0	0	0	3	9	3	0	1	18	0	0	64	0	0	0	0	65	0	17
Basidiomycota;Tremellomycetes;unidentified;unidentified;unidentified;Tremellomycetes_sp_2	15	0	2	1	10	39	1	29	24	77	9	7	58	17	0	5	1	59	3	31
Basidiomycota;Tremellomycetes;unidentified;unidentified;unidentified;Tremellomycetes_sp_3	1	1	1	1	0	13	9	0	0	0	4	6	9	0	0	1	0	158	8	181
Basidiomycota;Tremellomycetes;Trichosporonales;Trichosporonaceae;Trichosporon;Trichosporon_asahii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Basidiomycota;Tremellomycetes;Cystofilobasidiales;Cystofilobasidiaceae;Udeniomyces;Udeniomyces_pan	3	0	0	18	6	9	1	0	4	19	10	10	0	0	0	2	0	134	0	9
Basidiomycota;Tremellomycetes;Cystofilobasidiales;Cystofilobasidiaceae;Udeniomyces;Udeniomyces_pyri	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	782	0	0

Table 24. Table S5. Abundance table (number of reads) per sourdough

Taxonomy	B28	B29	B03	B30	B31	B32	B33	B04	B40	B41	B42	B43	B44	B05	B06	B07	B08	B09
Ascomycota;Dothideomycetes;Dothideales;Dothioraceae;Aureobasidium;Aureobasidium_pullulans	4	25	22	284	10	94	117	6	28	10	65	16	38	7	2	12	15	21
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Bullera;Bullera_globospora	4	10	24	2	6	17	23	12	14	3	59	6	8	4	3	39	2	22
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Bulleromyces;Bulleromyces_albus	5	3	1	0	0	10	3	4	10	1	12	18	3	1	0	19	7	6
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_humil	0	0	43	0	97879	15	4	27	9	3	0	12	17	1E+05	#####	23090	2E+05	22
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Candida;Candida_sake	1	0	0	0	0	0	16	72	6	15	5	350	#####	0	1	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Candida;Candida_xylopsoci	0	0	1	0	1	0	12	0	1	#####	59	7	3	0	0	0	0	0
Ascomycota;Dothideomycetes;Capnodiales;Cladosporiaceae;Cladosporium-;Cladosporium_sp	658	1409	614	491	283	410	2908	1348	2197	240	1245	1421	1663	1396	120	4785	754	8976
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_carnescens	5	21	0	0	3	5	120	3	30	9	3	15	16	8	7	9	4	19
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_chernovii	28	74	42	652	43	117	64	19	200	41	126	49	104	21	3	34	19	65
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_laurentii	3	0	8	0	0	1	54	12	105	0	1	3	5	4	0	2	0	10
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_magnus	2	3	2	37	4	7	0	0	0	0	8	0	0	0	6	2	0	0
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_oeirensis	3	120	1	199	35	20	8	2	19	7	14	2	13	2	3	9	1	10
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_sp	29	80	17	3	8	45	35	21	63	23	28	19	64	41	8	43	4	114
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_victoriae	150	302	206	500	79	311	328	187	702	111	364	521	489	204	30	271	142	864
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Cryptococcus;Cryptococcus_wieringae	1	64	34	470	39	142	40	1	25	17	133	7	47	36	6	13	4	88
Basidiomycota;Tremellomycetes;Cystofilobasidiales;Cystofilobasidiaceae;Cystofilobasidium;Cystofilobas	0	2	2	117	4	11	1	0	1	3	0	8	1	0	1	1	1	0
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Tremellaceae;Dioszegia;Dioszegia_hungarica	15	36	31	211	11	15	14	18	78	25	94	22	43	8	6	25	2	24
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Dipodascaceae;unidentified;Dipodascaceae_sp	1	2	1	0	0	0	11	8	0	3	6813	3	58	0	3	1	1	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Dipodascaceae;Dipodascus;Dipodascus_australiensis	0	0	0	0	0	0	6	11	0	2	5168	0	14	0	0	7	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Dipodascaceae;Dipodascus;Dipodascus_geotrichum	2	0	0	0	1	0	9	16	2	12	1806	10	161	0	7	1	7	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Dipodascaceae;Geotrichum;Geotrichum_loubieri	2	0	0	0	0	0	5	7	0	1	730	0	18	0	0	2	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Pichiaceae;Hyphopichia;Hyphopichia_pseudoburtonii	116	0	0	0	0	99	0	0	1	1	0	43	21	0	1	9	0	25
Basidiomycota;Tremellomycetes;Tremellales;Incertae_sedis;unidentified;Incertae_sedis_sp	3	0	17	5	0	10	3	10	6	2	73	5	10	4	1	10	1	26
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_austra	0	0	0	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_barne	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5	0	0	1	5
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_boza	2	13	1	152	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_bulde	0	0	75158	0	0	0	46634	22414	0	10	18	40	1393	6	7	25	5	87
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_serva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_saulg	0	0	6	0	0	0	10	6	0	0	0	0	0	10	9	2	6	5
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Kazachstania;Kazachstania_unisp	0	0	1	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	5	3	7	0
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Saccharomyces;Saccharomyces_ce	14262	8277	4	15919	7909	#####	1018	0	14230	#####	4978	14377	#####	24	1	0	1	2714
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Saccharomyces;Saccharomyces_uv	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	290	0	0	0	0	0
Basidiomycota;Microbotryomycetes;Sporidiobolales;unidentified;unidentified;Sporidiobolales_sp	32	84	62	3	6	45	89	46	352	31	195	265	177	22	12	49	24	59
Ascomycota;Saccharomycetes;Saccharomycetales;Saccharomycetaceae;Torulaspora;Torulaspora_delbrue	0	0	0	0	0	33	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Basidiomycota;Tremellomycetes;unidentified;unidentified;unidentified;Tremellomycetes_sp_1	0	0	4	8	2	10	5	1	0	0	10	4	1	3	0	3	1	4
Basidiomycota;Tremellomycetes;unidentified;unidentified;unidentified;Tremellomycetes_sp_2	9	1	29	2	7	75	18	9	55	16	20	48	35	23	3	37	19	56
Basidiomycota;Tremellomycetes;unidentified;unidentified;unidentified;Tremellomycetes_sp_3	11	32	3	75	10	22	1	0	10	26	12	6	4	1	0	0	0	7
Basidiomycota;Tremellomycetes;Trichosporonales;Trichosporonaceae;Trichosporon;Trichosporon_asahii	1	0	0	0	0	0	0	1	3	0	587	0	3	0	0	0	0	0
Basidiomycota;Tremellomycetes;Cystofilobasidiales;Cystofilobasidiaceae;Udeniomyces;Udeniomyces_par	3	11	60	64	9	27	15	6	8	10	46	28	36	16	4	11	5	46
Basidiomycota;Tremellomycetes;Cystofilobasidiales;Cystofilobasidiaceae;Udeniomyces;Udeniomyces_pyr	0	12	4	12	1	1	4	0	1	0	3	0	2	0	0	0	0	0

Table 25. Table S5. Abundance table (number of reads) per sourdough (continued)

Chapitre IV. Analyse de l'effet du terroir, des variétés de blé et des pratiques boulangères sur la diversité microbienne : une approche expérimentale participative

Ce chapitre sous forme d'article en préparation présente notre expérience participative de la graine au pain et les résultats. Cette expérience s'est ancrée dans une recherche d'action participation où des agriculteurs, boulangers, meuniers, scientifiques, associations ont participé et collaborés. Nous avons étudié la dispersion et la sélection de la communauté microbienne tout au long de la filière du pain au levain. Plus précisément, nous avons analysé l'effet du terroir, de la variété de blé et des boulangers sur le microbiote des levains et sur les qualités nutritionnelles et organoleptiques du pain.

L'analyse microbiologique de la dispersion microbienne de la graine au levain final révèle des trajectoires différentes de dispersion en fonction de l'espèce microbienne. Après 3 semaines de sélection dans un levain maintenu par des rafraîchis, une espèce de bactérie et une levure domine la communauté. Cette espèce apparait dans la chaine de dispersion soit à partir de la farine, soit le jour de l'initiation des levains, soit après 1 semaine de rafraîchis. Cette espèce sélectionnée n'est pas dépendante de l'origine de la farine (terroir, variétés de blé) mais est la même que celle du levain personnel du boulanger. Dans certains cas, cette espèce a une dynamique de croissance plus importante dans un type de variétés (moderne/ancienne). Le terroir, les variétés et les pratiques des boulangers impactent les propriétés nutritionnelles et organoleptiques des pains. Les composés aromatiques sont influencés par le terroir et la teneur en minéraux par les variétés de blé. Enfin, la pousse de la pâte, l'acidité des pains, la teneur en acides organiques et hydrates de carbone, la perception sensorielle sont impactées par le microbiote du levain. Ces résultats révèlent l'intérêt de maintenir des circuits locaux afin de conserver la diversité microbienne et d'offrir une diversité de produits alimentaires.

From wheat seeds to sourdough bread: microbial dispersion, selection and functional effect

Elisa Michel[a,b], Matthieu Barret[c], Véronique Chable[d], Hélène Chaudy*, Héloise Debroise[a], Marion Deffrasnes[a], Xavier Dell'Armi*, Xavier Dousset[e], Isabelle Goldringer[f], Stéphane Guezenec[b], Isabelle Hue[a], Julien Lebrat[b], Judith Legrand[f], Lili Moyses*, Thibault Nidelet[b], Michel Perrin*, Peggy Rigou[b], Philippe Roussel[g], Simon Rousselot[d], Olivier Rué[h], Estelle Serpolay-Besson[i], Sylvain Santoni[j], Bruno Taupier-Letage[k], Camille Vindras-Fouillet[k], Bernard Onno[a] and Delphine Sicard[b]

[a]Oniris, Laboratoire MicroBioTech, Rue de la Géraudière CS 82225, 44322 Nantes Cedex 3, France

[b]INRA, SupAgro, Université de Montpellier, UMR1083 Sciences pour l'Œnologie, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 01, France Montpellier

[c]INRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 42 rue Georges Morel, 49007 Beaucouzé Cedex, France

[d]INRA UMR BAGAP, Biodiversité Cultivée et Recherche Participative, Domaine de la Motte, 35 653 Le Rheu Cedex

[e]INRA, SECALIM Unit UMR1014, Oniris, Université Bretagne Loire, La Chanterie CS, 40307, Nantes Cedex 3 Oniris, INRA, Nantes

[f]Génétique Quantitative et Evolution-Le Moulon, INRA, Université Paris-Sud, CNRS, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France

[g]Triptolème, Ferme de Bobéhec - 56250 La Vraie-Croix

[h]Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, CIRM-Levures, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France

[i]ITAB Bretagne Biodiversité Cultivée, Domaine de la Motte, 35 653 Le Rheu Cedex

[j]INRA, UMR1334, Amélioration génétique et Adaptation des Plantes, Montpellier SupAgro-INRA-IRD-UMII, Montpellier, France

[k]Institut Technique de l'Agriculture Biologique (ITAB), F-75595, Paris, France

*Bakers

Highlights

- Evidence of microbial communities flux and selection along a food chain
- The sourdough microbial diversity is non randomly distributed over bakers and depend on his house microbiota.
- The common sourdough bacteria species, L. sanfranciscensis, is found in flour and could be dispersed long distance.
- Bread aroma depends on the wheat terroir and the house sourdough microbiota.
- Bread minerals content depends on the type of wheat varieties
- Bread sugar content, acidity, flavour depends on the house's sourdough microbiota.

Keywords

Ongoing microbial domestication, sourdough microbiota, bread, backslopping practices, human practices

Summary

Whereas the domestication has been well documented for plant, animal and more recently fungi species, the human impact on whole microbial communities remains to be better understood. Human has domesticated microbial communities for making fermented beverages and food since, at least, the Neolithic. Bread is one the most popular fermented product. Leavened bread can be made by adding commercial yeast but more traditionally it is made using sourdough, a mix of flour and water, naturally fermented by bacteria and yeast. Using a participatory research approach, we analysed how human impact the dispersion and selection of microbial community along the sourdough bread food chain. The effect of wheat terroir, wheat varieties and bakers on the sourdough microbiota and on bread nutritional and organoleptic properties were analysed. Analysis of microbial dispersion from seed to final sourdough, revealed different trajectories of dispersion depending on microbial species. After three weeks of selection in sourdough maintained by backslopping, one bacteria and one yeast species dominated the community. The selected fungi species depend on the bakery environment but not on the origin of the flour (wheat varieties or terroir) while the selected bacteria species, *L. sanfranciscensis* was also found in flour. The wheat terroir, varieties and sourdough microbiota impacted bread nutritional and organoleptic properties. Bread minerals content was influenced by the type of wheat varieties. Bread aroma compounds were mostly

influenced by the wheat terroir and the baker's house of sourdough. Finally, bread leavening, acidity, sugar content and sensorial perception were mostly impacted by the sourdough microbiota. All together these data revealed the interest of maintaining local food chains for conserving microbial diversity and offering food product diversity.

Introduction

Human has domesticated his environment and the microbial diversity since the Neolithic to ferment food and beverages (Dupont et al., 2016; Hittinger et al., 2018). Originally, fermentation of food substrates happens spontaneously from naturally contaminating microorganisms (Douglas and Klaenhammer, 2010). In order to preserve foods and to diversify their texture and flavour, human repeated and controlled the microbial ecosystem resulting in established fermentations practices (Prajapati and Nair, 2008). He used the ability of bacteria and yeast to ferment and produce alcohol, organic acids and selected for efficient microorganisms. The domestication history of several fermented products has been documented. Examples include cheese since 7500 BCE (Salque et al., 2013), beer since 4000 BCE (Gallone et al., 2018; Libkind et al., 2011), wine since 5000 BCE (Almeida et al., 2015; This et al., 2006), bread since 12000 BCE (Arranz-Otaegui et al., 2018; Carretero et al., 2017; Samuel, 2002; Shevchenko et al., 2014), etc. The analysis of the genetic basis of adaptation for domesticated microbial species have shown how human have selected some genetic variants with beneficial phenotypes in domesticated environments (Legras et al., 2007; Ropars et al., 2017). However, it is still unclear how human domestication impact the ecology of microbial communities. The aim of this work was to study how human influence the dispersion and selection of whole microbial communities and how this impact food quality.

Among fermented food, sourdough bread is of cultural and economical importance over the world. Through the ages, bread has been made with artisanal and traditional processes, using a sourdough as a leavening agent, a naturally fermented mix of flour and water, regularly mixed with water and flour. The sourdough bread chain is composed of six global steps. Farmers do grow wheat on their terroir with their own agricultural practices. The wheat grains is then harvested and crushed in flour on a mill based on specific millers' practices. The baker initiates his sourdough by mixing flour, water and leaves it for fermentation from hours to days. He maintains the sourdough by the addition of water and flour, a process called backslopping. He can keep it at different temperatures, from 4°C to decrease drastically the fermentation activity

up to 37°C to activate fermentation. This sourdough is added as a leavening agent to the dough composed of flour, water and salt. The fermented doughs are divided, shaped and baked in an oven with a bread-making process specific to each artisanal baker. A piece of the sourdough added in the kneader or a piece of dough taken after kneading is used as chief sourdough for the next bread-making. The sourdough can be maintained for years or reinitiated regularly.

The diversity of the sourdough microbiota has been already studied and reviewed (Carbonetto et al., 2018; Hittinger et al., 2018; De Vuyst et al., 2017). It includes yeasts belonging to the genus *Kazachstania*, *Torulaspora*, *Saccharomyces,* or *Wickeranomyces* (Carbonetto et al., 2018; Hittinger et al., 2018) and lactic acid bacteria belonging to the genus *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* (De Vuyst et al., 2017; Lattanzi et al., 2013; Lhomme et al., 2016a) with the predominant species *Lactobacillus sanfranciscensis*. The commonly reported density for lactic acid bacteria (LAB) is 10^9 CFU per gram of sourdough and 10^7 CFU per gram for yeasts (De Vuyst and Neysens, 2005; De Vuyst et al., 2017). Usually, the intra-sourdough species diversity is low with one bacterium and one yeast dominant species. By contrast the between sourdough diversity is higher with more than 50 bacteria species and 30 yeast species already identified in sourdough. No evidence of geographic structuration of microbial species distribution was found. By contrast, the bread-making practice and the house microbiota seems to have an important effect on sourdough microbiota (Minervini et al., 2015a, Urien et al, submitted, Michel et al. in preparation).

The origin of the microbial species found in sourdoughs is not yet elucidated. Do they come from the wheat terroir, wheat varieties, the farm, insects, the flour, the water, the baker or the bakery (utensils, worktable...)? Agricultural practices could be involved (Bonanomi et al., 2016; Lhomme et al., 2014, 2015a; Pontonio et al., 2016). For example, the yeast species *Kazachstania australis* was described in soil (Jacques et al., 2016) and in French natural sourdoughs (Michel et al. in preparation). *Lactobacillus plantarum* was described in endophytic wheat ecosystem (Minervini et al., 2018, Pontonio et al., 2018). Moreover, Minervini et al. (2018) described flours containing species belonging to genera *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Enterobacteriaceae family*. They described *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Leuconostoc citreum*, *Weissella cibaria*, *Pediococcus pentosaceus* in durum wheat flours and *L. sanfranciscensis*, *Ln. citreum* in soft wheat flours (Minervini et al., 2018). Finally, the house microbiota was found to impact the sourdough bacteria species, as for cheese (Gobbetti et al 2018, Irlinger et al., 2015, Bokulich and Mills, 2013, Quijada et al., 2018). The practices of the

baker could also play a role with the use of additional ingredients (Minervini et al., 2014, Michel et al. in preparation). It is still unclear to what extent the origin of the flour and the bakers select for a specific sourdough microbiota over backslopping. The functional diversity of sourdough microbial community has not been well documented neither.

In this study, we ask how human impact the dispersion of microbial community along a low input bakery food chain. We analysed ongoing microbial community domestication during initiation and maintenance of sourdough by backslopping. Finally, we disentangle the effect of the wheat terroir, wheat varieties and sourdough microbiota on bread nutritional and organic properties. We used an interdisciplinary participatory research approach including farmers, miller, bakers, bio-mathematicians, microbiologists, bioinformaticians and agronomists. The questions, experiments and results interpretation were shared by all participants. The results of this important participatory research revealed the important role of baker's house /practices on sourdough microbial species diversity and the effect of wheat terroir and sourdough microbiota on bread aroma compound and flavor perception. They show the interest of maintaining local food chain for conserving microbial diversity and offering a diversity of food product to consumers.

Materials and methods

1. Participatory experimental design

1.1. Seeds samples

Three populations of wheat landraces, Saint Priest et le Vernois Rouge, Redon Roux Pâle and Bladette de Provence and three varieties of commercial wheat, Renan, Pireneo and Chevalier have been grown each on three organic terroirs by farmers (Table 26). The seeds were sown in autumn 2014 and harvested in July 2015. The characteristics of each variety are described in tableau S1. Sowing were made in conditions of production in the seed drill of 3 meters, with three repetitions of five modalities by plot of land. Modalities were randomized between farms. The seeds were sorted with an optical sorter, an air column and a cleaner-separator. They were stored in dehydrated room in 20-25°C till the end of October, then in 10°C without dehydration to fight against weevils. For each terroir, grains from the three landraces were mixed and so were grains from the three modern varieties. We collected approximately 250g (6 bags of 40g) of seeds of each varieties and of the mixing lots for microbiota analysis (Table 27). The samples were stored at -20°C at the laboratory.

Varieties	Wheat type	Origin	Aristation	Protein Content
Renan	Commercial	France	Bearded	Medium
Pireneo	Commercial	Austria	Bearded	Quite high
Chevalier	Commercial	Austria	Bearded	Quite low
Saint Priest et le Vernois Rouge	Ancient	Auvergne, France	No- bearded	Medium
Redon Roux Pâle	Ancient	Brittany, France	No- bearded	Medium
Bladette de Provence	Ancient	Provence, France	No- bearded	High

Table 26. Table S1. Characteristics of the wheat varieties cultivated by four French bakers
Source: Arvalis and “des blés bio…diversité”, technical document, 2011

Varieties		Terroir	Number of samples	Total number of samples
Landraces wheat	Bladette de Provence	T3	2	36 samples of seeds
	Bladette de Provence	T4	2	
	Saint Priest et le Vernois Rouge	T3	2	
	Saint Priest et le Vernois Rouge	T4	2	
	Redon Roux Pâle	T3	2	
	Redon Roux Pâle	T4	2	
Modern wheats	Chevalier	T3	2	
	Chevalier	T4	2	
	Renan	T3	2	
	Renan	T4	2	
	Pireneo	T3	2	
	Pireneo	T4	2	
Seeds mixes	Landraces	T4	2	
		T2	2	
	Modern	T3	2	
		T4	2	
		T6	2	
		T3	2	

Table 27. Table S2. Wheat seeds sampling

1.2. Milling and flours sampling

The mixing lots were sent to a French miller who is also a farmer-baker (Baker B3). Crushing and sifting were performed with an Astrie stone-mill. An Astrie mill is composed of two streaked millstones. It is used often by farmer-bakers producing organic flours. To avoid contaminations from one lot to another, the miller ground in alternation one lot of the study and one of his own seeds. We collected samples of flours at the beginning and the end of the milling for each lot. Flours of the miller were sampled at the beginning and at the end (Table 28). The samples were stored at -20°C at the laboratory for future microbial culture-independent analyses.

	Varieties	Terroir	Number of samples	Total number of samples
Beginning of the milling	Landraces	T4	2	26
		T2	2	
		T3	2	
		T4	2	
	Modernes	T6	2	
		T3	2	
End of the milling	Landraces	T4	2	
		T2	2	
		T3	2	
		T4	2	
	Modernes	T6	2	
		T3	2	
Flours from the miller	Modernes	Miller	2	

Table 28. Table S3. Flours sampling

1.3. Sourdough samples

The flours of the six seeds lots were sent to four different bakers, who initiated and maintained six sourdoughs for three weeks. Each baker received a pallet with 10 kg of each flour, buckets for each sourdough and sample pots for the sampling. They also got a scoresheet to follow the temperature of the flour, of the bakery, of the water; the weight of flour and water at each backslopping; the temperature where the sourdoughs were stored and comments on the sourdoughs such assmell, aspect, etc. Each baker made the sourdoughs with his own protocol, although the same one had to be used for the six received flours. Bakers were asked to have their hands washed between each sourdough back-slopping. The bakers took samples of

sourdough, approximately 40 grams, the day of the initiation, after one week, two weeks and three weeks of back-sloppings and stored the samples at -20°C. They were stored at 4°C for culture-based analysis and at -20°C for metabarcoding analysis. We experimented the same protocol of sourdough preparation and sampling with the six flours in a laboratory environment.

1.4. Doughs and breads

After the 3 weeks of backsloppings, 1 kg of each sourdough were collected for the bread-making in a lab pilot bakery. Two backsloppings were made (2 days before the bread-making and 1 day before the bread-making with 2h of fermentation) and sourdoughs were maintained at 4°C before bread-making. Bread-makings were realized between 2 and 5 days after the collect of the sourdoughs. Bread doughs were made using a standardized process for all sourdoughs. A mix of 28% water (of the total dough weight), 43% of flour (of the total dough weight), 30% sourdough (30%) and salt (0.8%) was kneaded for 15 minutes. The flour used to make the dough was the same as the one that was used to initiate and maintain the sourdough. Therefore, six different flours were used in parallel. Kneading were realized in 3 phases, a slow kneading for 4 min at 11 rpm, then an autolyse of 10 min and a fast knading for 2 min at 200 rpm. Doughs were left aside for a total fermentation time of five hours at 28°C, with a bulk fermentation of 120 min, a first proof of 20 min and a final proof of 140 min. Doughs were divided in dough pieces of 500 grams. the shaping was made manually. Dough pieces were baked of 30 min at 235°. Part of the breads was stored at -20°C for physico-chemical analysis. The other part was sent to partners for sensorial analysis after baking. Overall, a total of 24 groups of breads were obtained: they were made by the six sourdoughs of each of the four bakers and their corresponding flour.

2. Microbial analysis

2.1. Culture-based method on sourdoughs, enumeration and isolates identification

Ten grams of each sample of sourdough from the last sampling after three weeks was diluted in 90 mL of TS (0.1% tryptone, 0.85% NaCl) and mixed for 2 min with a Stomacher (AES Laboratoire, France). Cascade dilutions were performed from 10^{-2} to 10^{-8} and plated with a spiral plater (Interscience, France) on Yeast Peptone Dextrose agar (4 g/L Yeast Extract, 8 g/L glucose, 6.8 g/L agar) and MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar) supplemented with maltose (10 g/L) and cysteine (0.5 g/L). For YPD, plates were incubated at 28°C for two-three days. Thirty colonies from those plates were picked randomly and isolated on YPD agar. DNA from

each yeast colony was extracted according to MasterPure Yeast DNA purification kit (Epicentre, Epibio) after enumeration. The isolates were identified as described in Michel et al (2018) and Urien et al (2018). For Lactic Acid Bacteria (LAB), plates were incubated for 48 h at 30 °C under anaerobic conditions (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Germany). After LAB enumeration, approximately 15 bacterial colonies from each sample were selected and, after overnight culture on MRS, maltose (0.05%) and cysteine (1%), these were stored at -80 °C with 40% glycerol. LAB isolates were identified as detailed in Michel et al. (2016).

2.2. Preparation and DNA extraction of seeds, flours and sourdoughs microflora

The micro-organisms associated to seeds were obtained by maceration, following the protocols established by the International Seed Testing Association. Ten grams of seeds were macerated in 40 mL of buffer PBS Tween 20 (0.05% v/v) for 40 hours at 4°C with constant stir (200 rpm). The macerates were filtered with Stomacher® bags. The filtrates were centrifuged at 5000 rpm, during 10 min at 4°C. We kept 2 mL of the supernatant and mixed with the deposits. DNA of the macerates was extracted with the Powersoil DNA isolation kit (MoBio) as explained in the manufacturer's protocol.

Five grams of each flours were weighed, mixed with 35 mL of buffer PBS and homogenised for 5 min. The mix was centrifuged at 1000 rpm, for 5 min at 4°C. We kept the supernatant, realized a new centrifugation at 2500 rpm for 15 min at 4°C. The deposit was suspended in 500 µL of PBS buffer. As previously, the flours filtrates were extracted with the Powersoil DNA isolation kit (MoBio).

Finally, 200 milligrams of sourdough were transferred to a PowerSoil® Bead Tube and DNA was extracted according to the PowerSoil DNA Isolation Kit instructions (Qiagen, USA). For each matrix, DNA was stored at −20 °C. Concentration and purity were checked using a spectrophotometer (Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, ThermoFisher Scientific).

2.3. MiSeq sequencing

DNA from seeds, flours and sourdoughs were amplified for the barcode *ITS1* (ITS1F-ITS2) to describe Fungi ecosystem and 16S (V3-V4) for bacteria ecosystem. Framshifts were used to increase the quality of the sequences (De Souza et al., 2016). The ITS1 region was targeted with the PCR primers ITS1-F (5′- CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA - 3′) and ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (Buée et al., 2009). Reactions were held at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles of amplification at 94 °C (60 s), 55 °C (60 s) and 78 °C (90 s) with

a final extension step of 4 min at 68 °C. 16S (V3-V4) rDNA region was targeted with the PCR primers 16SV3F (5'-TACGGRAGGCAGCAG-3') and 16SV4R (5'-TACCAGGGTATCTAATCCT-3'). Cycling reactions were held at 94 °C for 1 min, followed by 30 cycles of amplification at 94 °C (60 s), 55 °C (60 s) and 72 °C (60 s) with a final extension step of 10 min at 72 °C. All PCR reactions were performed with a high-quality polymerase (MTP Taq DNA Polymerase, Merck). A second round of amplification was performed with purified amplicons and primers containing the Illumina adapters and indexes, as explained in the protocol of Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina). The sequencing run was performed with MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles).

2.4. Sequences analyses

Sequences were analysed through FROGS "Find Rapidly OTU with Galaxy Solution" (Escudie et al., 2015) and home-made pipelines, as described in Michel et al., 2018 (Figure 26). Affiliations were realized using several databases, including UNITE (Kõljalg et al., 2005), YeastIP (Weiss et al., 2013), and a custom databases for fungi. Custom databases were built after sequencing of isolates for barcodes on *ITS* region (ITS1, 5.8S, ITS2) with Sanger technology. Silva (release 132- 13/12/17) (Pruesse et al., 2007) and Greengenes (May 2013) (DeSantis et al., 2006) were used for bacteria.

3. Physico-chemical analysis of sourdoughs, doughs

In addition to microbial analysis, pH and Total Titrable Acidity of the sourdough and bread samples were analysed in triplicate with an automatic titrator using a 10-mL (pH-Matic 23, Grosseron) as described in Michel et al., (2016).

4. Bread analysis

The volume of bread loaves was determined by rapeseed displacement in accordance with the AACC International (2001) Method 10-05.01. Bread density (g/cm^3) was calculated from the mass/volume ratio. Bread maximum heights and maximum' widths were measured.

For the analysis of minerals and carbohydrates contents, samples of freeze breads were cut, lyophilized and powdered. Minerals, Iron, Zinc, Copper, Phosphorus, Magnesium, Sodium, Potassium and Calcium were measured with a microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy (Microondes Speedwave, PS-AES Agilent). Results were expressed as in mg/Kg of the element per kilogram of dry bread.

For bread carbohydrates, 5 g of bread was added to 10 grams of milliQ water. Samples were centrifuged at 4500 rpm for 10 minutes. 1 ml of the supernatant was transferred into 2 mL microtube. Carrez I (125 µL) and Carrez II (125 µL) reagents and NaOH 0.1M (250µL) were added to eliminate proteins and lipids. The liquid was centrifuged at 13000 rpm for 5 minutes. The supernatant was filtered with syringe and disc-filter 0.2µm. Glucose, fructose and organic acids succinate, lactate and acetate, glycerol, ethanol was measured by HPLC in triplicates, expressed as g/kg of bread.

For the analysis of volatiles compounds content, and for each slice of bread, three crumb samples of 1.5g were placed into SPME vials and spiked with 0.75µg of internal standard 4-nonanol diluted in ethanol. Samples were incubated for five min at 60°C on a heating agitator CombiPal (CTC Analytics AG) and volatiles compounds were extracted in the headspace with a SPME triphased fibre Divinylbenzene Carboxene Polydimethylsiloxane for 1 hour at 60°C. The volatiles compounds adsorbed on the fibre were desorbed in the injector of a gaseous chromatography (GC Trace, Thermoscientific) for 3 min at 250°C with a split less mode. The extracted volatiles compounds were analysed by a gaseous chromatography coupled with a mass spectrometry. The separation of the compounds was made on a DBWAX column, dimensions 30m, 0,25, 0,25, with helium as vector gas in a flow of 1.2 ml per min, and in a temperature of 40°C during 3 min followed by a gradient of temperature of 6°C per min until 245°C, this last temperature being maintained during 5 min. The acquisition of the mass spectra was made on a simple spectrometer quadripole ISQ (ThermoScientific) in electronic impact and in full house scan on a mass range of 46-400 m/z. The compounds were identified par comparison of the spectra with NIST, Wiley databases and custom databases. Only the compounds which present a percentage of correlation with the spectrum of the database upper to 80 % were kept. The semi quantification of the identified compounds was realized by internal calibration with 4-nonanol on area comparison basis.

Sixteen breads were analysed by sensory analysis: breads from modern and ancient varieties mix, coming from the same two terroirs (crop environment) and made with sourdoughs of the four bakers (2 types of varieties x 2 terroirs x 4 bakers). Sensorial profile was determined by a napping test where sensorial distance and occurrence of the descriptors are calculated. With a list containing descriptors, e.g. lactic or acetic aromas, soft, fat, rancid, milky taste, fungi, fermented fruit, cereals, the panel described each bread. If one of the aromas quoted the list was perceived on the bread, the panel had to estimate its intensity from 1 to 9. With a panel of 24 judges, not pulled but expert, breads were analysed with the Napping (Dehlholm et al., 2012). After tasting, breads were positioned on a space in two dimensions according to their

resemblances and disparities, to characterize in a spontaneous way product by one or two descriptors. Judge homogeneity was verified by correspondence analysis and any judges of the Napping test was removed.

5. Data statistical treatments

The analysis of microbial communities from cultural microbiology and high-throughput sequencing, multivariate statistics and graphics were conducted by using the packages Phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013b), ggplot2 (Wickham, 2016) through R. Trees were constructed with Seaview (Gouy et al., 2009). Phyloseq permitted the representation of networks, flux representation on phylogenetic tree, the draw of rarefaction curves. PCoA was made from a dissimilarity matrix of weighted Unifrac distance. Alpha (Chao1, SE-Chao1, Shannon) and beta diversity indexes were measured with vegan package (Oksanen et al., 2016). Constrained Analysis of Principal Coordinates (CAP) permitted to find associations between community composition and environmental variables. It regressed a weighted Unifrac distance matrix of against some covariates using linear models. Permutative Multivariate analysis (PERMANOVA) were performed to test terroir and varieties effect on weighted Unifrac distance.

Data of minerals, volatiles compounds, organics acids, carbohydrates, bread density, height and width were analysed by Principal Component Analysis and linear models. Because the experimental design was not balanced, we used two different linear models. The first one was used to analyse data from terroir T3 and T4 where both types of wheat varieties were grown. It allows us to test for terroir and wheat varieties effect independently. The second one was used to analyse all data, including the four terroirs. Because only ancient wheat population were grown on terroir T2 and only modern varieties were grown on terroir T6, the terroir and varieties were not tested independently but as a single variable, corresponding to the six different flours used in the experiment. The first model could be written as :

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijkl} \text{ avec } \varepsilon_{ijklm} \sim N\,(0,\sigma^2)$$

where Y_{ijkl} was the content of a mineral, carbohydrate, organic acid, organic acid, bread density, hight or width; α was the fixed baker's effect (i=LM, HS, MP, PV, LL), β the fixed wheat varieties effect (j=modern, ancient), δ the fixed terroir (k=T3, T4). The second and third order interactions were in the residuals.

The second model could be written as:

$$Y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varphi_l + \varepsilon_{ijklm} \text{ with } \varepsilon_{ijklm \sim N\,(0,\sigma^2)}$$

where Y_{ijklm} was the content of a mineral, carbohydrate, organic acid, organic acid, bread density, height or width; α was the fixed baker's effect (i=LM, HS, MP, PV, LL), β the flour effect k, i.e. the terroir by wheat origin of the flour (k=F1, F2, F3, F4, F5, F6 with F1=flour of ancient wheat population grown on terroir T3=T3_anc, F2=T4_mod, F3=T2_anc, F4=T3_mod, F5=T4_anc, F6=T6_mod). The second order interactions were in the residuals.

Sensory analysis was analysed by correspondence analysis; fermentation data, minerals data and volatils compounds were analyzed by principal component analysis.

Results

1. Microbial community diversity along the bread food chain

A total of 190 samples were analysed by MiSeq sequencing. More precisely, 36 seed samples were analysed (Table 27 and Table 28), including 2 independent seed samples of varieties "Saint Priest et le Vernois Rouge", Redon Roux Pâle and Bladette de Provence (ancient wheat populations), Renan, Pireneo and Chevalier (modern varieties) grown on 2 terroirs (T3 and T4) and 2 independent samples of a mix of these ancient and modern varieties grown on three terroirs (T3, T4, T2 and T3, T4 and T6 respectively). A total of 26 flours were analysed (Table S3). Four flour samples of each mix of varieties (ancient/modern) from each terroir (three terroirs par mix) were analysed at the beginning of the milling and at the end of the milling. Two samples of flours from the miller were also added as a controlled. Finally, 128 samples of sourdoughs were analysed, including *i)* 34 sourdoughs J0 (initiation of the sourdoughs) composed of seven sourdoughs from each of the four bakers (6 experimental sourdoughs and one house sourdough), as well as six experimental sourdoughs made in the laboratory from the six flours (ancient/modern mix x 3 terroirs) *ii)* 30 sourdoughs at sampling time S1 (week 1), corresponding to the same sourdoughs than the J0 ones collected one week later, but the four baker's own sourdoughs were not analysed; *iii)* 30 sourdoughs at sampling time S2 (week 2) and *iv)* 34 sourdoughs at sampling time S3 (week 3).

The depth of the sequencing depends on the matrix. For the V3-V4 16S rDNA barcode, samples of seeds had from 22577 to 62529 reads per sample, flours from 687 to 12450, sourdough J0 from 397 to 41363, sourdoughs S1 from 2808 to 62461 (mean of 47868), sourdough S2 from 43613 to 77419 and sourdoughs S3 from 39599 to 73134. The low number of reads for samples

of flours and some samples of J0 sourdoughs are explained by the high level of mitochondria amplified, more than 90% of the relative abundance in some cases. The OTUs identified as Mitochondria were removed of the abundance table (Table S4 and Table S5). For the ITS1 barcode, samples of seeds had from 51616 to 124790 reads per sample, flours from 57454 to 121032, sourdough J0 from 14848 to 249604, sourdoughs S1 from 38888 to 224084, sourdoughs S2 from 32563 to 210350 and sourdoughs S3 from 27102 to 201653. Abundance tables were then rarefied, see rarefaction curves (Figure 39, Figure 40).

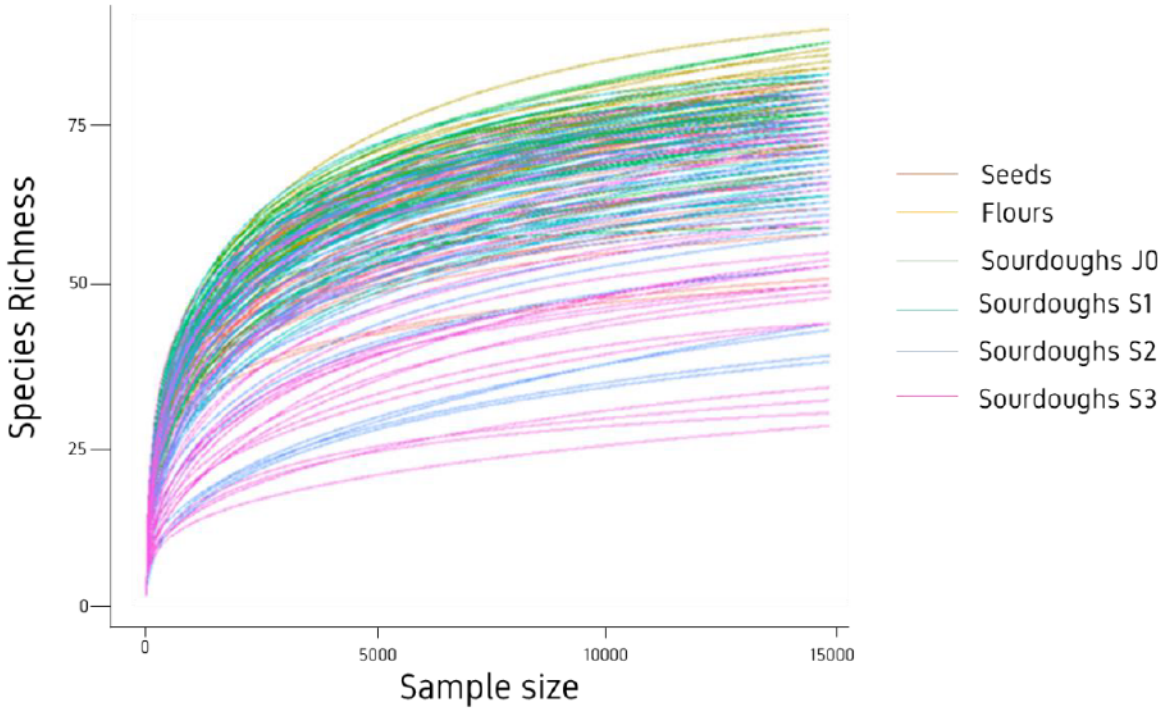


Figure 39. Rarefaction curves of ITS1 barcode colored by matrix, e.g. seeds, flours, J0, S1, S2 and S3

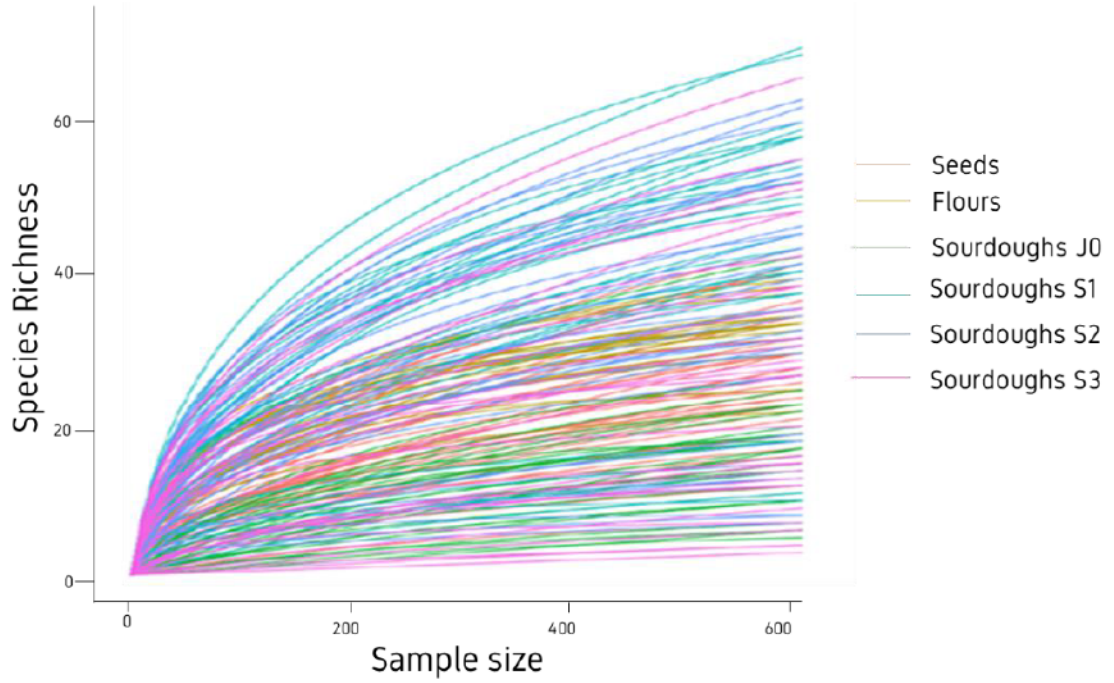


Figure 40. Figure S4. Rarefaction curves of V3 V4 16S rDNA barcode colored by matrix, e.g. seeds, flours, J0, S1, S2 and S3

A total of 418 bacterial OTUs were detected with the V3-V4 16S rDNA barcode. They belong to the phylum *Actinomycota* (13 OTUs), *Bacteroidetes* (15 OTUs), *Cyanobacteria* (one OTU), *Firmicutes* (158 OTUs) and *Proteobacteria* (231 OTUs). A total of 152 fungal OTUs was obtained with the *ITS1* barcode. They belong to the phylum *Ascomycota* (86 OTUs), *Basidiomycota* (61 OTUs), *Mucoromycota* (one OTU) and four OTUs unclassified to the phylum level. The number of genus detected per sample ranged from 24 to 46 for fungi and 8 to 15 for bacteria (Table 29). Overall, seeds had a slightly lower number of microbial genera (47 fungi genus and 17 bacteria genera in average over sample) than flour (51 fungi genus and 22 bacteria genera in average over sample). In sourdoughs, the number of genera decreased over backslopping from 48 to 41 fungi genera and from 25 to 17 bacteria genera in average (Table 29, Figure 43). Across all ecosystems, most genus had a frequency below 0.1 (Table 29). In average, a sample had from 2 to 3 fungi genera and from 1 to 3 bacteria genera at a frequency greater than 0.1. For fungi, in average, seeds had no genus over 0.3 frequency; flour, initial and one-week sourdough (J0, S1) had no genus over 0.4 frequency and two weeks sourdough had no genus over 0.5 frequency. Three weeks sourdoughs were the only samples to have dominant genus (Freq >0.5). For bacteria, the pattern was different. All ecosystems (seed, flour,

sourdough) had in average a dominant bacteria genus (freq>0.5), except the initial sourdough that had in average only one genus over 0.4. (Figure 43,Table 29).

For bacterial diversity, the seeds microbiota was characterized by 143 OTUs, with 124 OTUs (99.2% of the relative abundance) identified as *Proteobacteria*, including 42 OTUs (57%) belonging to the genus *Pantoea* and 47 OTUs (39%) to the genus *Pseudomonas*. The flours microflora contained 43 OTUs. The number of bacterial genus and the shannon index were higher in flour and newly initiated sourdough than on seed and mature sourdough (Figure 42, Table 29). This was also the case at the species level. For fungal diversity, the seeds across all samples had 99 OTUs, the flour 105 OTUs and the sourdough 115 OTUs. In contrast to what was found for bacteria, the fungal alpha diversity was not higher in flour compared to seed and decreased regularly in sourdough over backslopping.

2. A “core” microbial community found in seeds, flour and sourdoughs samples

A total of 6 OTUs were found in all ecosystems (seeds, flour, sourdoughs) at a freq > 0.1. Among them there was 3 fungal OTUs and 3 bacteria OTUs (Table S5). For fungal species, it includes *Alternaria infectoria*, *Mycosphaerella tassiana* and *Vishniacozyma victoriae* (Figure 2A, Table S5). For bacteria species, it includes *Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas sp.*. Some OTUs were found in seeds, in flours but not in sourdoughs. This was the case for the fungal OTUs identifed as *Fusarium sp.*, *Fusarium equiseti*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium paczoskii*, *Claviceps purpura*, *Diaporthe cynaroidis*, *Microdochium phragmitis*, *Neoacochyta paspali*, *Kazachstania australis*, *Protomyces inouyei*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Filobasidium magnum*, *Symmetrospora coprosmaen*, *Bucklezyma aurantiaca*, *Genolevuria amylolytica* and *Saïtozyma paraflava* (Figure 2). It was also the case for the bacterial OTUs identified as *Paenibacillus sp.*, *Pseudomonas viriflada*, *Enterobacter hormaechei*, *Atlantibacter hermannii*, *Erwinia tolletana*, *Pseudomonas sp.*, *Arthrobacter agilis*, *Pseudomonas viridflava*, *Pseudomonas fluorescens*, *Methylobacterium sp.* and *Massilia sp.* (Figure 2). The fermentative bacterial and fungal species detected in sourdough were not found in seeds and flour except *L. sanfranciscensis* that was found in flour.

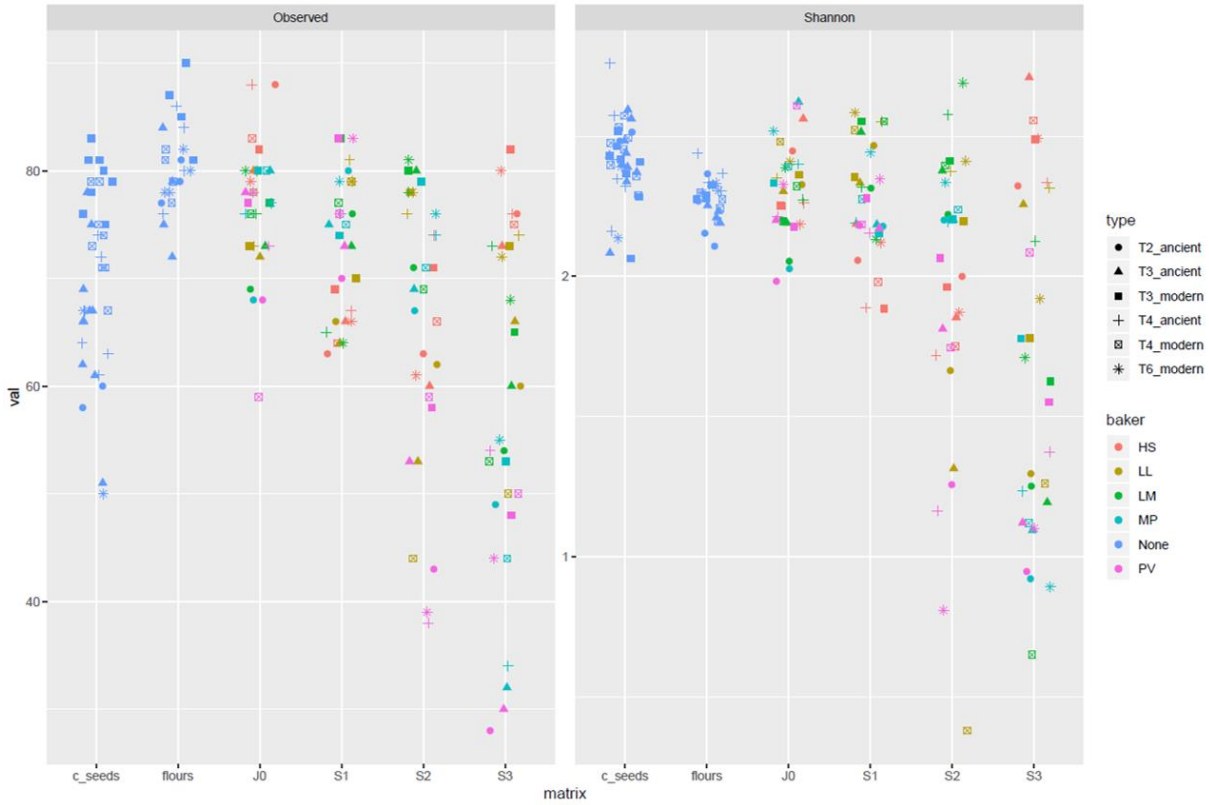


Figure 41. Figure S2. Alpha diversity (Specific richness on the left; Shannon index on the right) for *ITS1* barcode, calculated at species level

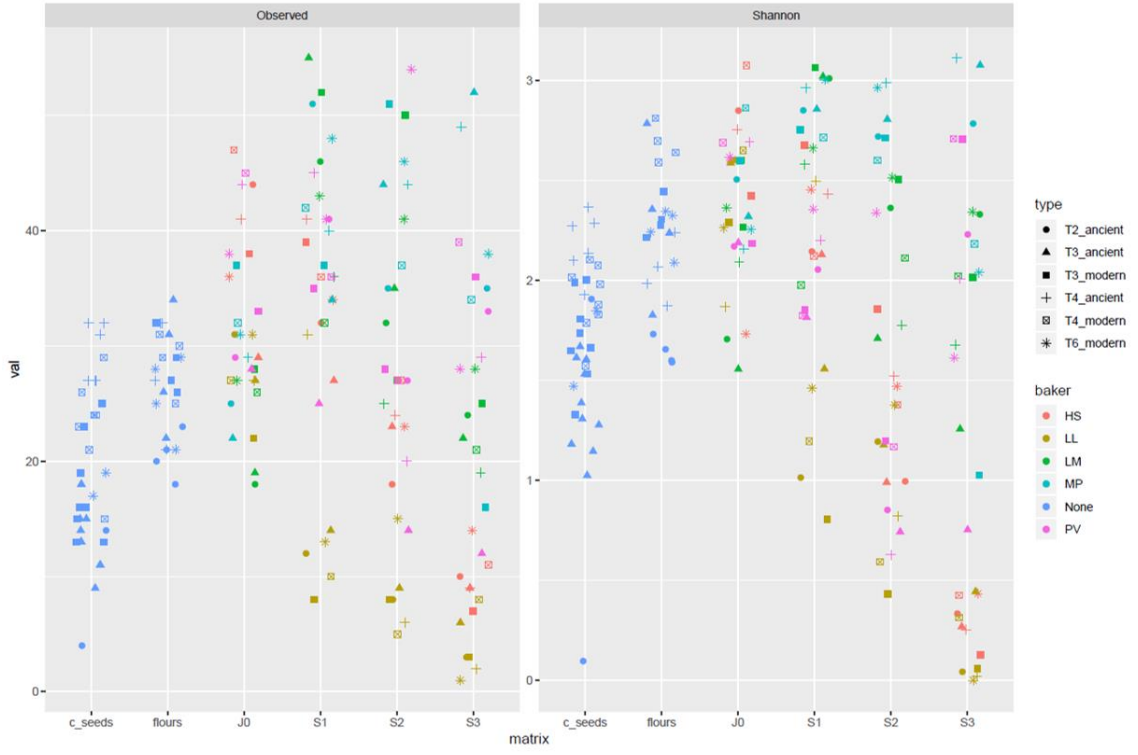


Figure 42. Figure S3. Alpha diversity (Specific richness on the left; Shannon index on the right) for V3-V4 16S rDNA barcode, calculated at species level.

	Mean count						Min count						Max count					
	All	>1%	>10%	>20%	>30%	>40%	>50%	All	>1%	>10%	>20%	>30%	>40%	>50%	All	>1%	>10%	>20%	>30%	>40%	>50%
Bacterial genus																					
Seeds	17.03	2.83	1.89	1.72	1.44	1.22	0.94	9	1	1	1	1	1	0	21	6	2	2	2	2	1
Flours	21.54	7.46	2.75	1.33	1.04	0.88	0.58	15	5	2	1	0	0	0	24	10	6	2	2	2	1
Sourdoughs J0	24.63	8.83	2.8	1.5	0.77	0.57	0.33	14	5	1	1	0	0	0	32	17	5	3	2	1	1
Sourdoughs S1	23.53	5.4	2.27	1.83	1.23	0.83	0.67	11	2	1	1	0	0	0	32	13	4	3	2	2	1
Sourdoughs S2	20.97	4.03	1.57	1.3	1.03	0.97	0.83	10	1	1	1	0	0	0	30	10	4	3	2	2	1
Sourdoughs S3	16.67	2.33	1.27	1.13	1	0.93	0.9	8	1	1	1	0	0	0	30	10	4	2	2	1	1
Bacterial species																					
Seeds	30.06	4.42	1.97	1.67	1.33	1.06	0.75	15	1	1	1	1	1	0	37	8	3	2	2	2	1
Flours	29.04	8.42	2.58	1.33	1.04	0.83	0.58	19	5	2	1	0	0	0	34	13	4	2	2	2	1
Sourdoughs J0	37.33	9.9	2.7	1.47	0.67	0.5	0.3	17	6	1	1	0	0	0	56	16	5	3	1	1	1
Sourdoughs S1	47.13	8.47	2.5	1.67	1.03	0.57	0.4	23	3	2	0	0	0	0	67	18	4	3	2	1	1
Sourdoughs S2	42.8	6.37	1.7	1.33	1.03	0.9	0.73	20	2	1	1	0	0	0	65	14	4	3	2	2	1
Sourdoughs S3	34.2	4.53	1.9	1.27	0.97	0.9	0.67	15	1	1	1	0	0	0	62	12	4	2	2	2	1
Fungal genus																					
Seeds	46.86	9.83	3.25	1.25	0.22	0.03	0	38	8	2	0	0	0	0	51	12	5	2	1	1	0
Flours	50.75	9.29	3.25	1.54	0.54	0	0	46	8	2	1	0	0	0	54	12	4	2	1	0	0
Sourdoughs J0	48.3	9.97	3.27	1.2	0.7	0	0	40	7	2	1	0	0	0	53	13	4	2	1	0	0
Sourdoughs S1	48	9.17	3.03	1.43	0.5	0.2	0.1	41	6	2	1	0	0	0	52	13	4	2	1	1	1
Sourdoughs S2	45.77	8.23	2.8	1.43	0.6	0.5	0.37	32	3	1	1	0	0	0	52	13	5	2	1	1	1
Sourdoughs S3	41.47	7.53	2.13	1.5	0.9	0.77	0.63	24	2	1	1	0	0	0	52	14	5	3	2	2	1
Fungal species																					
Seeds	69.19	11.08	3.25	1.25	0.22	0.03	0	56	8	2	0	0	0	0	76	15	5	2	1	1	0
Flours	78.38	9.58	3.25	1.54	0.54	0	0	74	8	2	1	0	0	0	83	12	4	2	1	0	0
Sourdoughs J0	76	10.33	3.27	1.2	0.7	0	0	53	7	2	1	0	0	0	84	16	4	2	1	0	0
Sourdoughs S1	75.23	9.47	3.03	1.43	0.5	0.2	0.1	65	7	2	1	0	0	0	84	13	4	2	1	1	1
Sourdoughs S2	70.93	8.33	2.8	1.43	0.6	0.5	0.37	48	3	1	1	0	0	0	84	13	5	2	1	1	1
Sourdoughs S3	62.6	7.57	2.13	1.5	0.9	0.77	0.63	35	2	1	1	0	0	0	81	15	5	3	2	2	1

Table 29. Table 1. Specific richness of bacteria genus, bacteria species, fungi genus and fungi species.

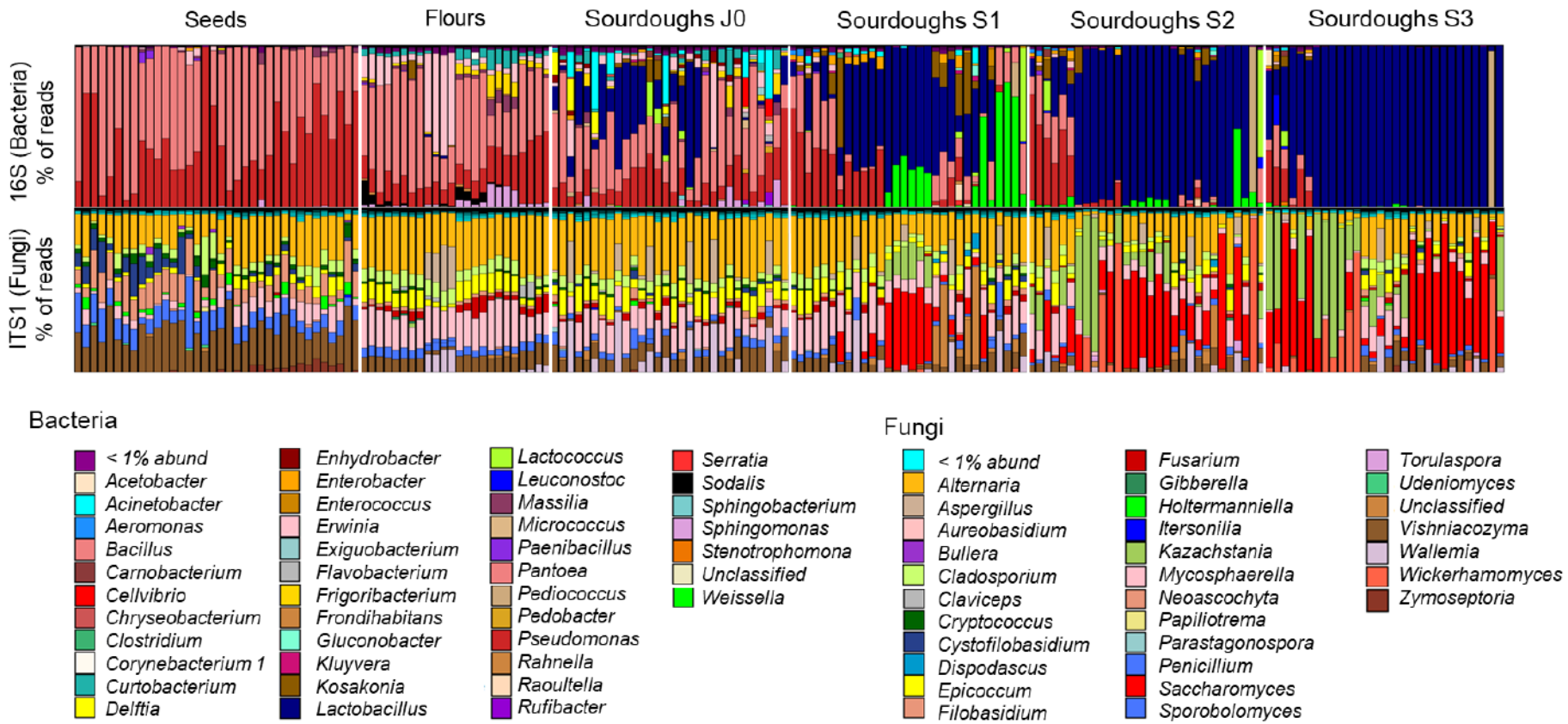


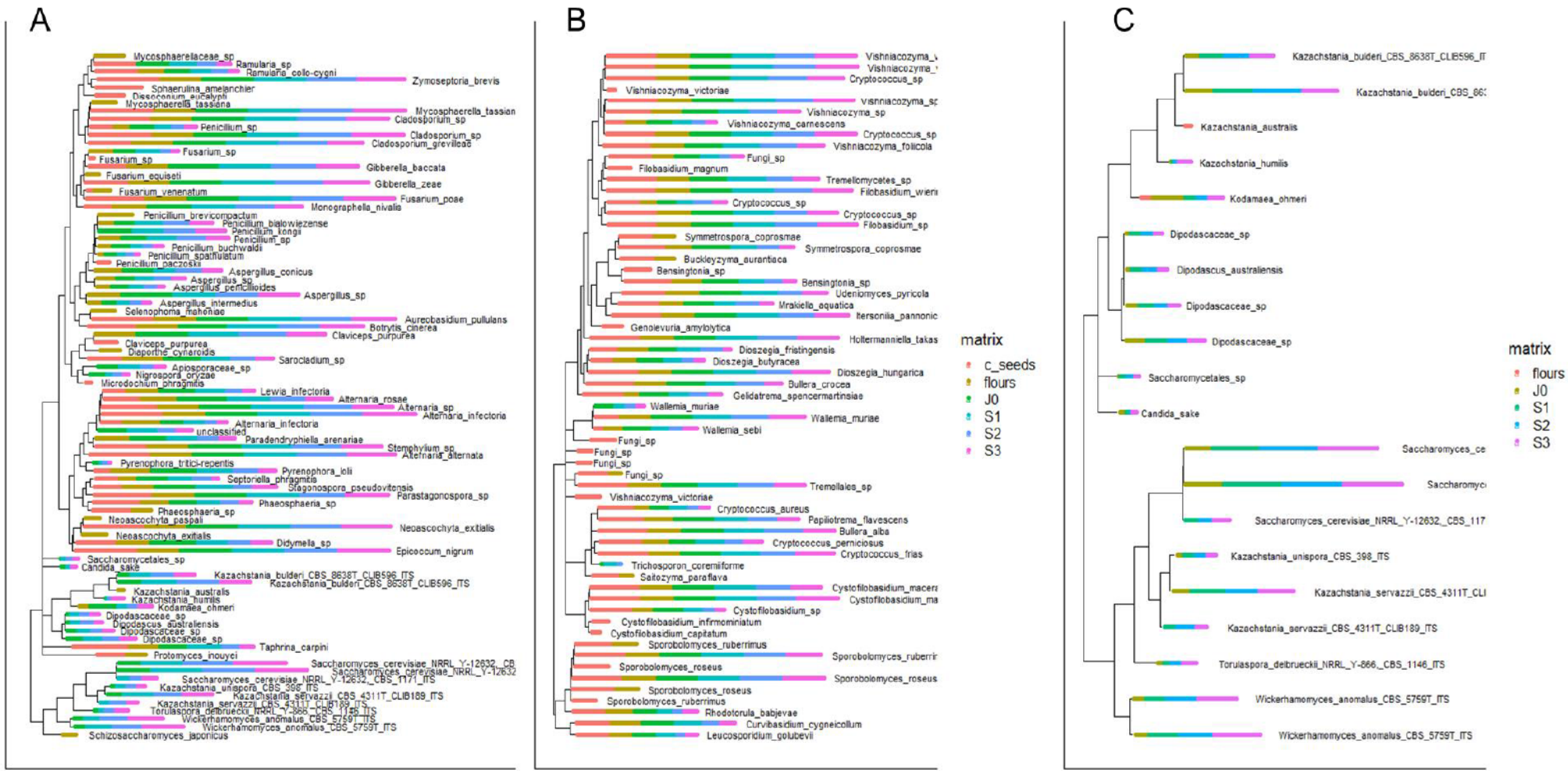
Figure 43. Figure 1. Distribution of Fungi and Bacteria genus abundance across Seeds, Flours, Sourdoughs Communities

Each column shows the genera relative abundances for a sample of seeds, flour, sourdough J0 (day of sourdoughs initiation), sourdough S1 (after 1 week), sourdough S2 (2 weeks) or sourdough S3 (3 weeks). Top row shows bacterial data (V3-V4 16S rDNA) and bottom row fungal (ITS1) data.

3. Microbial community changes from seed to three weeks old sourdoughs

The frequency of fungal phylum (*Ascomycota* and *Basidiomycota*) changed from the seeds to three weeks old sourdoughs (S3), with *Basidiomycota* mostly found in seeds (freq >0.6) and *Ascomycota* mostly found in sourdoughs S3 (freq >0.8). This could reflect selection of *Ascomycota* in sourdough and/or a change of fungal composition in the field and in the baker's house environments. Over all and with a frequency over 0.1, the seeds hosted *Filobasidium*, *Vishniacozyma*, *Alternaria* genera, the flours *Alternaria*, *Mycosphaerella*, the sourdoughs J0 *Cladosporium*, *Alternaria*, the sourdoughs S1 and S2 *Alternaria*, *Mycosphaerella*, *Saccharomyces* and the sourdoughs S3 hosted *Saccharomyces*, *Kazachstania, Wickeranomyces* (Figure 43, Figure 44, Table S4). Figure 43 and Table S5 showed that *Kazachstania* genus was dominant (Freq > 0.5) in 8 out of 30 samples, *Saccharomyces* in 14 out of 30 samples and *Wickerhamomyces* in two out of 30 samples. The eight others have not a yeast species found with a freq >0.5. Over all and with a frequency >0.1, the seeds hosted mainly *Pantoea*, *Pseudomonas* bacterial genera, the flour hosted *Pantoea*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, the sourdoughs J0 *Lactobacillus,* the sourdoughs S1 *Weissella*, *Lactobacillus* and the sourdoughs S2 and S3 *Lactobacillus* (Figure 43, Table S5). As shown in Figure 1, in sourdoughs J0, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Erwinia* genera were always present but in less relative abundance and genera *Acinetobacter* and *Lactobacillus* appeared. The sourdough S1 contained *Pantoea, Pseudomonas*, *Weissella*, genus and differs from sourdough J0 with the presence of *Weissella* (freq >0.1). Finally, *Lactobacillus* was dominant (Freq >0.5) for 26 out of 30 samples of sourdoughs S3, and *Pediococcus* for one out of 30 samples (Figure 43, Table S5).

The change of microbial communities over ecosystems was visualized by constructing a network based on the weighted Unifrac distances between samples (Figure 45). Different patterns were found for fungi and bacteria. The fungal network showed a link between the fungal composition of seeds, flours and young sourdoughs J0 and S1 (Figure 45). Sourdoughs S2 and S3 formed diverse small subnetworks, clustering samples partly according to the baker of origin, reflecting an important divergent evolution of the fungal composition in S2 and S3 sourdoughs among bakers. The bacterial network was more broken. It showed many small subnetworks, a large subnetwork of seeds, flours and initial sourdoughs (J0) samples and a tight subnetwork of three weeks old sourdoughs (S3) clustering together with some S2 sourdoughs. This last subnetwork contained mature sourdoughs of three bakers reflecting that bacterial composition of sourdoughs from these bakers have converged (Figure 45).


A
Mycosphaerellaceae_sp
Ramularia_sp
Ramularia_collo-cygni
Zymoseptoria_brevis
Sphaerulina_amelanchier
Dissoconium_eucalypti
Mycosphaerella_tassiana
Mycosphaerella_tassiana
Cladosporium_sp
Penicillium_sp
Cladosporium_sp
Cladosporium_grevilleae
Fusarium_sp
Fusarium_sp
Gibberella_baccata
Fusarium_equiseti
Gibberella_zeae
Fusarium_venenatum
Fusarium_poae
Monographella_nivalis
Penicillium_brevicompactum
Penicillium_bialowiezense
Penicillium_kongii
Penicillium_sp
Penicillium_buchwaldii
Penicillium_spathulistum
Penicillium_paczoskii
Aspergillus_conicus
Aspergillus_sp
Aspergillus_penicillioides
Aspergillus_sp
Aspergillus_intermedius
Selenophoma_mahoniae
Aureobasidium_pullulans
Botrytis_cinerea
Claviceps_purpurea
Claviceps_purpurea
Diaporthe_cynaroidis
Sarocladium_sp
Apiosporaceae_sp
Nigrospora_oryzae
Microdochium_phragmitis
Lewia_infectoria
Alternaria_rosae
Alternaria_sp
Alternaria_infectoria
Alternaria_infectoria
unclassified
Paradendryphiella_arenariae
Stemphylium_sp
Alternaria_alternata
Pyrenophora_tritici-repentis
Pyrenophora_loli
Septoriella_phragmitis
Stagonospora_pseudovitensis
Parastagonospora_sp
Phaeosphaeria_sp
Phaeosphaeria_sp
Neoascochyta_paspali
Neoascochyta_exitialis
Neoascochyta_exitialis
Didymella_sp
Epicoccum_nigrum
Saccharomycetales_sp
Candida_sake
Kazachstania_bulderi_CBS_8638T_CLIB596_ITS
Kazachstania_bulderi_CBS_8638T_CLIB596_ITS
Kazachstania_australis
Kazachstania_humilis
Kodamaea_ohmeri
Dipodascaceae_sp
Dipodascus_australiensis
Dipodascaceae_sp
Dipodascaceae_sp
Taphrina_carpini
Protomyces_inouyei
Saccharomyces_cerevisiae_NRRL_Y-12632_CB
Saccharomyces_cerevisiae_NRRL_Y-12632
Saccharomyces_cerevisiae_NRRL_Y-12632_CBS_1171_ITS
Kazachstania_unispora_CBS_398_ITS
Kazachstania_servazzii_CBS_4311T_CLIB189_ITS
Kazachstania_servazzii_CBS_4311T_CLIB189_ITS
Torulaspora_delbrueckii_NRRL_Y-866._CBS_1146_ITS
Wickerhamomyces_anomalus_CBS_5759T_ITS
Wickerhamomyces_anomalus_CBS_5759T_ITS
Schizosaccharomyces_japonicus
B
Vishniacozyma_victoriae
Cryptococcus_sp
Vishniacozyma_victoriae
Vishniacozyma_sp
Vishniacozyma_carnescens
Cryptococcus_sp
Vishniacozyma_folicola
Fungi_sp
Filobasidium_magnum
Tremellomycetes_sp
Filobasidium_wieri
Cryptococcus_sp
Cryptococcus_sp
Filobasidium_sp
Symmetrospora_coprosmae
Symmetrospora_coprosmae
Buckleyzyma_aurantiaca
Bensingtonia_sp
Bensingtonia_sp
Udeniomyces_pyricola
Mrakiella_aquatica
Itersonilia_pannonic
Genolevuria_amylolytica
Holtermanniella_takas
Dioszegia_fristingensis
Dioszegia_butyracea
Dioszegia_hungarica
Bullera_crocea
Gelidatrema_spencermartinsiae
Wallemia_muriae
Wallemia_muriae
Wallemia_sebi
Fungi_sp
Fungi_sp
Fungi_sp
Fungi_sp
Tremellales_sp
Vishniacozyma_victoriae
Cryptococcus_aureus
Papiliotrema_flavescens
Bullera_alba
Cryptococcus_perniciosus
Cryptococcus_frias
Trichosporon_coremiforme
Saitozyma_paraflava
Cystofilobasidium_macer
Cystofilobasidium_ma
Cystofilobasidium_sp
Cystofilobasidium_infirmominiatum
Cystofilobasidium_capitatum
Sporobolomyces_ruberrimus
Sporobolomyces_ruberri
Sporobolomyces_roseus
Sporobolomyces_roseus
Sporobolomyces_roseus
Sporobolomyces_ruberrimus
Rhodotorula_babjevae
Curvibasidium_cygneicollum
Leucosporidium_golubevii
matrix
c_seeds
flours
J0
S1
S2
S3
C
Kazachstania_bulderi_CBS_8638T_CLIB596_IT
Kazachstania_bulderi_CBS_863
Kazachstania_australis
Kazachstania_humilis
Kodamaea_ohmeri
Dipodascaceae_sp
Dipodascus_australiensis
Dipodascaceae_sp
Dipodascaceae_sp
Saccharomycetales_sp
Candida_sake
Saccharomyces_ce
Saccharomyc
Saccharomyces_cerevisiae_NRRL_Y-12632_CBS_117
Kazachstania_unispora_CBS_398_ITS
Kazachstania_servazzii_CBS_4311T_CLI
Kazachstania_servazzii_CBS_4311T_CLIB189_ITS
Torulaspora_delbrueckii_NRRL_Y-866._CBS_1146_ITS
Wickerhamomyces_anomalus_CBS_5759T_ITS
Wickerhamomyces_anomalus_CBS_5759T_ITS
matrix
flours
J0
S1
S2
S3

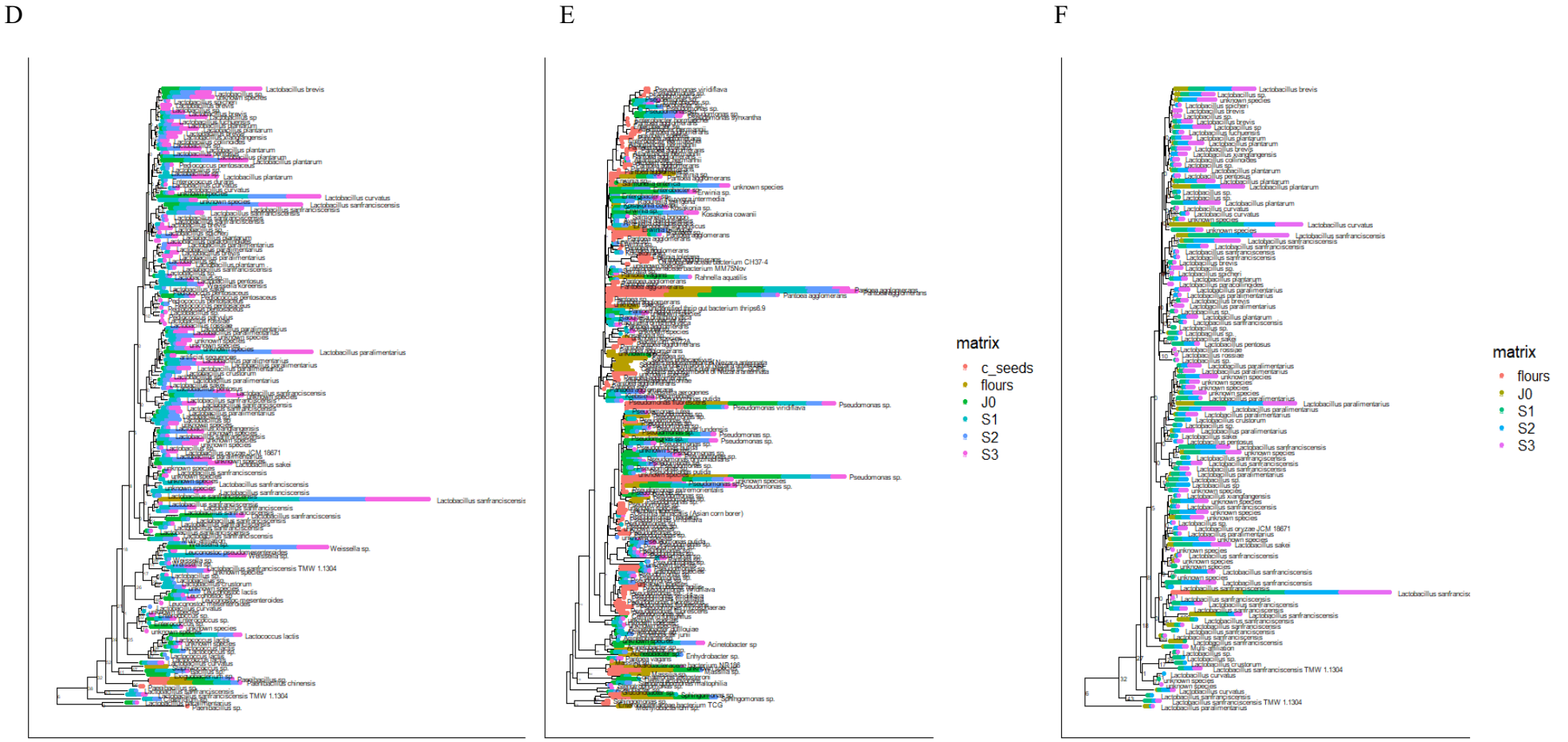


Figure 44. Figure 2. Fungal dispersion of (A) *Ascomycota*, (B) *Basidiomycota*, (C) *Saccharomycetales,* (D) *Firmicutes*, (E) *Proteobacteria*, (F) *Lactobacillus* from the wheat seeds, flours, sourdough at day 1 (J0), week 1 (S1), week 2 (S2) and week 3 (S3).

Each line represents an OTU. Samples are represented for each ecosystem and time sampling, cultivated seeds (●), flours (●), sourdoughs J0 (●), sourdoughs S1 (●), sourdoughs S2 (●), sourdoughs S3 (●).

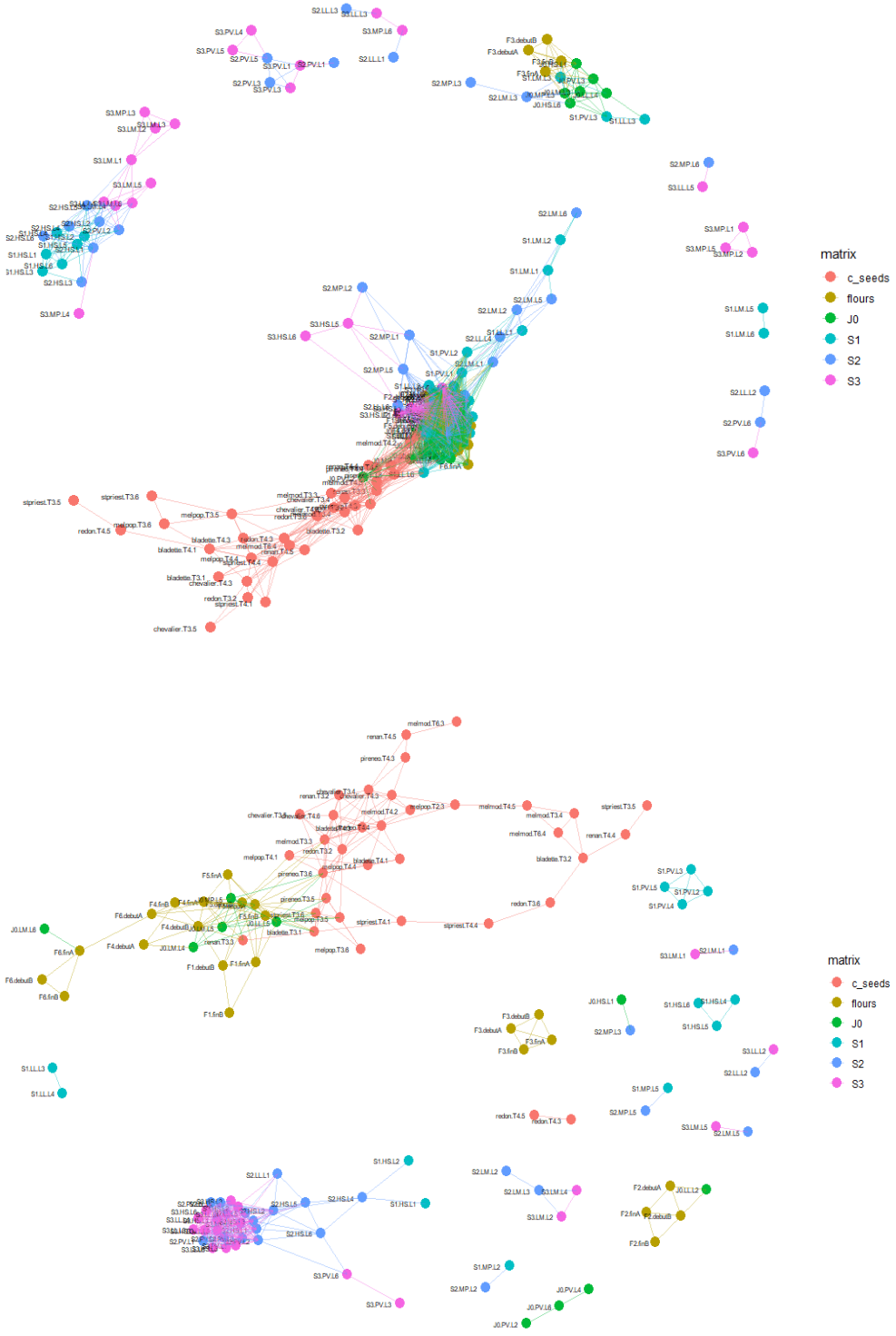


Figure 45. Figure 3. Network, constructed with weighted Unifrac distances calculated on fungi OTUs (A) and bacterial OTU (B).

The samples are represented for each ecosystem and time sampling, seeds (●), flours (●), sourdoughs J0 (●), sourdoughs S1 (●), sourdoughs S2 (●), sourdoughs S3 (●). Each sourdough sample is named by the age of the sourdough (from 0 to 3 weeks: J0, S1, S2, S3), the baker's code (MP, HS, LM, PV), the flour used for backslopping (L1 to L6). Each seed sample is named by the wheat variety or mix of varieties, the terroir, the repetition number. Each flour sample is names by the flour number (F1, F3, F5, F2, F4, F6)

After three weeks of backslopping, sourdoughs contained mostly lactic acid bacteria (LAB) and yeasts. Among the 30 sourdoughs, 19 sourdoughs contained a dominant lactic acid bacteria (LAB) species (Freq>0.49), 16 of which had *Lactobacillus sanfranciscensis* as dominant species. Seven sourdoughs had two or three co-dominant LAB species (*L. plantarum*/*L. paralimentarius* or *Lactobacillus sp.*/*L. paralimentarius* or *L. brevis*/*L. plantarum*/*L. paralimentarius*), two had *L. curvatus* at frequency below 0.3 and two had LAB at freq <0.1.

LAB were found only in sourdough ecosystems except *L. sanfranciscensis* that was also detected in flour. There were 28 OTUs identified as *L. sanfranciscensis*, reflecting a high intraspecific diversity. Interestingly only one out of the 28 *L. sanfranciscensis* OTUs was found in flour and this OTU was also the most frequent *L. sanfranciscensis* OTU in sourdoughs (Figure 2B). In a previous study, *L. sanfranciscensis* was found as dominant in 23/30 French sourdoughs (Lhomme et al., 2015; Michel et al., 2016; chapitre III). All together these data suggested a possible dispersion of this species among bakers by flour. On the phylogenetic tree representing the phylogenetic distribution of *Lactobacillus* OTUs, the other *Lactobacillus* species appeared in sourdoughs since the beginning of the sourdough initiation (J0 or S1) but not in seeds or flours Figure 44, Table S5). The origin of these species might therefore be the baker's house environments and the bakers.

Yeast dominant species found by culture-dependant method and metabarcoding were *Kazachstania servazzii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania bulderi*. These species were not found in seed and flour but were found only in sourdough, suggesting an origin from the baker's environment or the bakers.

4. Drivers of microbial community diversity

The microbial community that colonize sourdough could be shaped in part by the terroir of origin of the wheat, the wheat varieties or the baker's practices and house environment. We test to what extent these factors have driven the sourdough microbiota diversity using a permutational univariate analysis of variance on weighted Unifrac distances matrices. revealed that all ecosystems, seeds, flours, sourdough J0, S1, S2 and sourdoughs S3 impact significantly the microbial community for fungi (F=32.148, p=0.0001) and bacterial composition (F=61.95, p= 0.0001) (Figure 46).

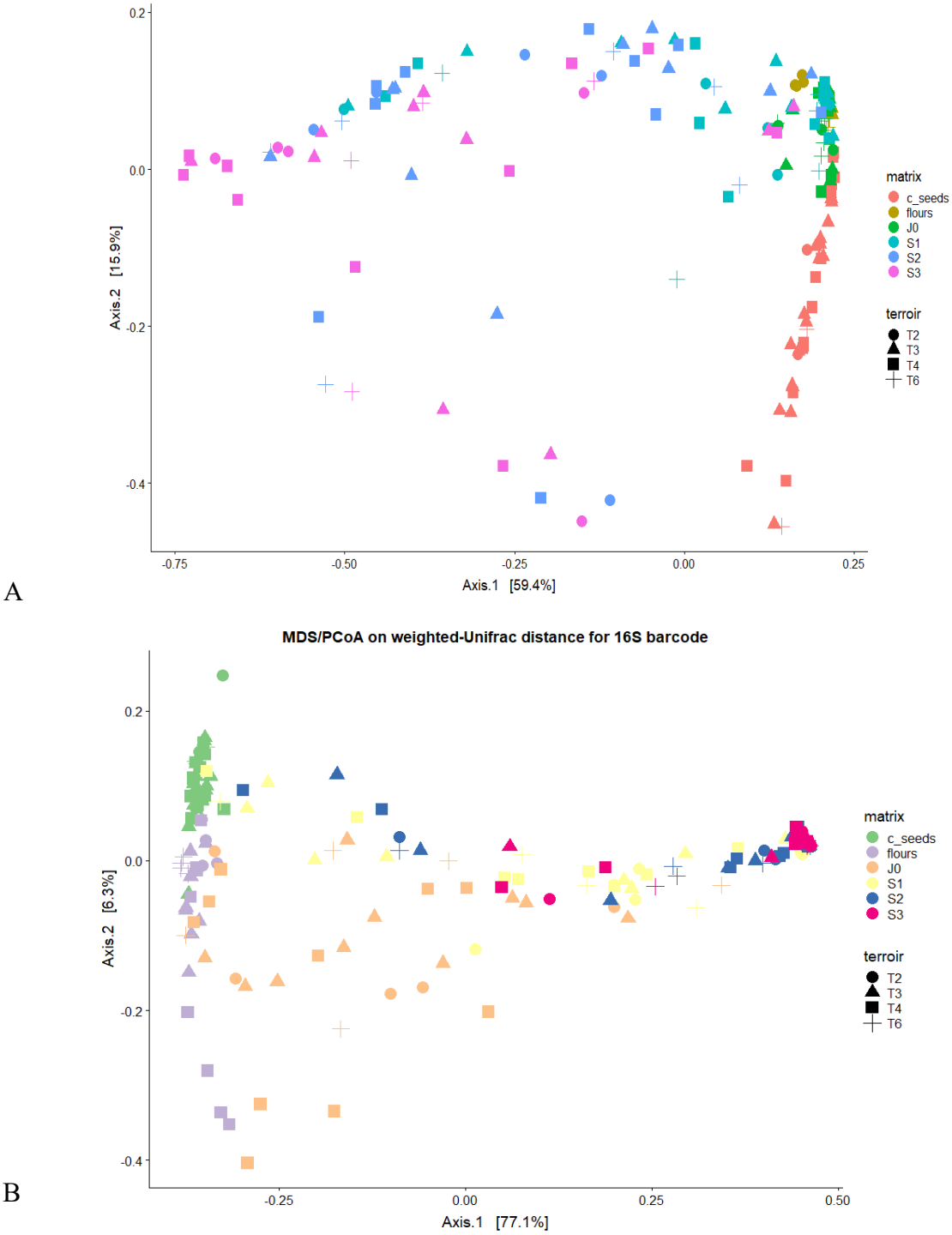


Figure 46. Figure 4. PCoA on weighted-Unifrac distance on ITS and V3-V4 16S rDNA barcode

Weighted-unifrac distances were calculated with sequence phylogenetic distance and fungal (A) bacterial abundance table (B). Principal Coordinates Analysis (PcoA) was realized on weighted-unifrac distance matrix of fungal or bacterial samples and the distances were projected into Euclidean space. Axis 1 and 2 are represented. The distance between two samples represents the weighted-Unifrac distance. Each color represent a ecosystem, e.g. seeds, flours, J0 sourdoughs, S1 sourdoughs, S2 sourdoughs, S3 sourdoughs. Terroirs are symbolised with a symbole, T2 (●), T3 (▲), T4 (■), T6 (+).

The fungal species diversity on seeds and flours was influenced by the terroir and the wheat varieties (p=0.026 and p=0.0001 respectively) (Table 2). The day of the initiation of the sourdough, the fungal community was still impacted by the flour (p = 0.04) but not anymore by the wheat varieties (p = 0.59). The fungal community of sourdoughs S1 was drived by the baker (p=0.0001) and still flours (p=0.0046). From the sourdough S2 to the final sourdough S3 (Table 2), the baker was the main driver of the fungal species diversity (p= 0.0001). Interestingly, the terroir had a marginally significant impact on three weeks sourdough fungal diversity (p =0.08). Like for fungi, the bacterial species diversity (Table 2) on seeds and flours was influenced by the terroir (p= 0.0011 and p= 0.0001, respectively). They were impacted by the wheat varieties, with a marginally significant p-value for the seeds (p= 0.055). The sourdough bacteria species composition was not driven by the flour (p > 0.3). The sourdoughs (J0, S1, S2 and S3) bacteria species diversity was only significantly influenced by the bakers (p= 0.0001)(Table 30).

	Seeds		Flours		Sourdoughs J0		Sourdoughs S1		Sourdoughs S2		Sourdoughs S3	
Fungi	F value	PR (>F)	F value	PR (>F)	F value	PR (>F)	F value	PR (>F)	F value	PR (>F)	F value	PR (>F)
Terroir	2.61	**0.026**	65.55	**0.0001**	-	-	-	-	-	-	-	-
Wheat varieties	16.49	**0.0001**	16.027	**0.0001**	-	-	-	-	-	-	-	-
Flours	-	-	-	-	2.19	**0.04**	3.49	**0.0046**	1.31	0.22	1.76	0.08
Bakers	-	-	-	-	0.78	0.59	30.25	**0.0001**	5.34	**0.0001**	20.13	**0.0001**
Bacteria	F value	PR (>F)	F value	PR (>F)	F value	PR (>F)	F value	PR (>F)	F value	PR (>F)	F value	PR (>F)
Terroir	4.99	**0.0011**	24.89	**0.0001**	-	-	-	-	-	-	-	-
Wheat varieties	3.28	0.0545	58.59	**0.0001**	-	-	-	-	-	-	-	-
Flours	-	-	-	-	0.82	0.59	0.82	0.59	0.74	0.66	1.19	0.30
Bakers	-	-	-	-	16.29	**0.0001**	16.29	**0.0001**	27.17	**0.0001**	13.35	0.0001

Table 30. Table Results of multivariate PERMANOVA for fungi and bacterial abundance data. Permutations were based on a Weighted Unifrac distance matrix

5. Dynamic of microbial community composition in sourdoughs over backsloppings

The dynamic of microbial community during "ongoing domestication" is a result of selection and of input from house microbiota and flour (itself related to wheat varieties and terroir). Bakers made between 5 to 10 backsloppings during the three weeks of experimentation (Table 31).

We analysed the dynamic of microbial species that was found dominant at least once after three weeks of backslopping. The dynamic was different depending on the yeast species (*Kazachstania bulderi*, *Kazachstania servazzii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus,* Figure 47). Interestingly, the wheat variety also changed the dynamic of species colonisation. The species *Kazachstania servazzii*, and *Kazachstania bulderi* present respectively in MP and PV sourdoughs, appeared the first week of initiation and increased faster over the weeks in sourdoughs made with ancient varieties than modern varieties. The species *Wickerhamomyces anomalus* appeared later in sourdoughs, after two weeks of backsloppings and increased faster in sourdoughs made with modern varieties than in ancient varieties. The two co-occurring species *Kazachstania servazzii* and *Saccharomyces cerevisiae* appeared in sourdoughs HS during the first week of experimentation. The proportion of *S. cerevisiae* increased and the one of *K. servazzi* decreased in sourdoughs S2 made with ancient varieties. At sourdoughs S3, the species *Kazachstania servazzi* outcompeted *S. cerevisiae* and became more frequent. In sourdoughs LM where *S. cerevisiae* was the only dominant species, the species *S. cerevisiae* appeared the first week of experimentation and increased in frequency during the three weeks, similarly for sourdoughs made with ancient and modern varieties. Finally, in lab sourdoughs, *S. cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus* increased faster in sourdoughs made with ancient varieties and appeared in sourdoughs made with modern varieties during the second week of backsloppings and the third week respectively. *Kazachstania servazzii* appeared only in sourdoughs made with modern varieties the second week.

Concerning the bacterial species, the dynamic of *Lactobacillus sanfranciscensis*, *L. brevis*, *L. paralimentarius*, *L. curvatus*, *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus plantarum* were represented in Figure 47. The dynamic of installation of all these species seems to be the same for sourdoughs made with ancient and modern varieties, except for the species *Pediococcus*

pentosaceus only found in a sourdough made with modern wheat varieties in the laboratory. The sourdoughs made by the baker MP contained *L. curvatus*, by baker PV *L. sanfranciscensis* and *L. paralimentarius*, by the baker HS, *L. sanfranciscensis*, *L. curvatus* and *L. paralimentarius*, by baker LM *L. plantarum* and *L. paralimentarius* (Figure 47). Laboratory sourdoughs contained *Pediococcus pentosaceus* and *L. sanfranciscensis* as dominant in S3 sourdoughs (freq >0.5), despite the dominance of *L. curvatus* after 1 week of back-sloppings in sourdoughs made with flours 1 and 5.

Finally, after 10 back-sloppings for the baker LM (Table 31), the six sourdoughs initiated and maintained for three weeks had the same dominant species, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum*. This result is observed for the other bakers, but less and less marked linked to the number of backsloppings (Table 31). Across all bakers, the experimental sourdough dominant species were the same than the one found in the baker's own sourdough. The microbial community found in sourdough made at the laboratory was more diverse despite the high number of backsloppings (Table 31).

	B1	**B2**	**B3**	**B4**	**Lab sourdough**
Total number backsloppings	5	7	9	10	13
Week 1	1	2	3	3	4
Week 2	1	3	3	2	4
Week 3	3	2	3	5	5

Table 31. Table S6. Number of back-sloppings made by bakers each week of the experiment

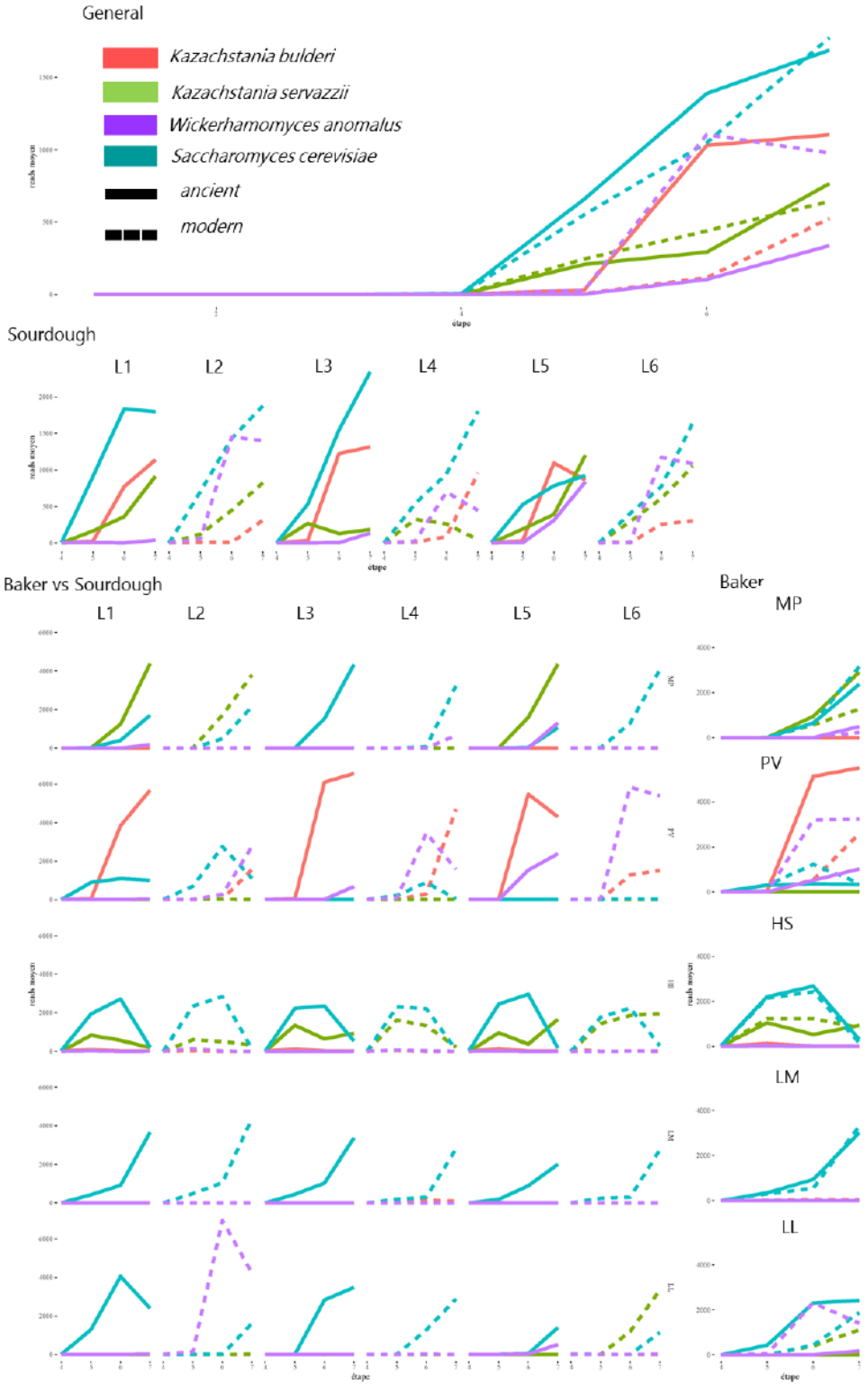


Figure 47. Figure 5A. Dynamic of yeast sourdough main species based on relative abundance, e.g. *Kazachstania bulderi*, *Kazachstania servazzii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus* in sourdough J0, S1, S2, S3 for each baker (MP, PV, HS, LM) and lab sourdoughs (LL).

The dynamic per type of wheat varieties is indicated in line for ancient varieties and dashed lines for modern wheat varieties. Number of steps: Seeds (1), flours (2), sourdoughs J0 (3), sourdoughs S1 (4), sourdoughs S2 (5), sourdoughs S3 (6). A) At top is represented the global dynamic of those 4 species over time. B) In the middle is represented the dynamic per baker and C) at bottom the dynamic for each sourdough of each baker.

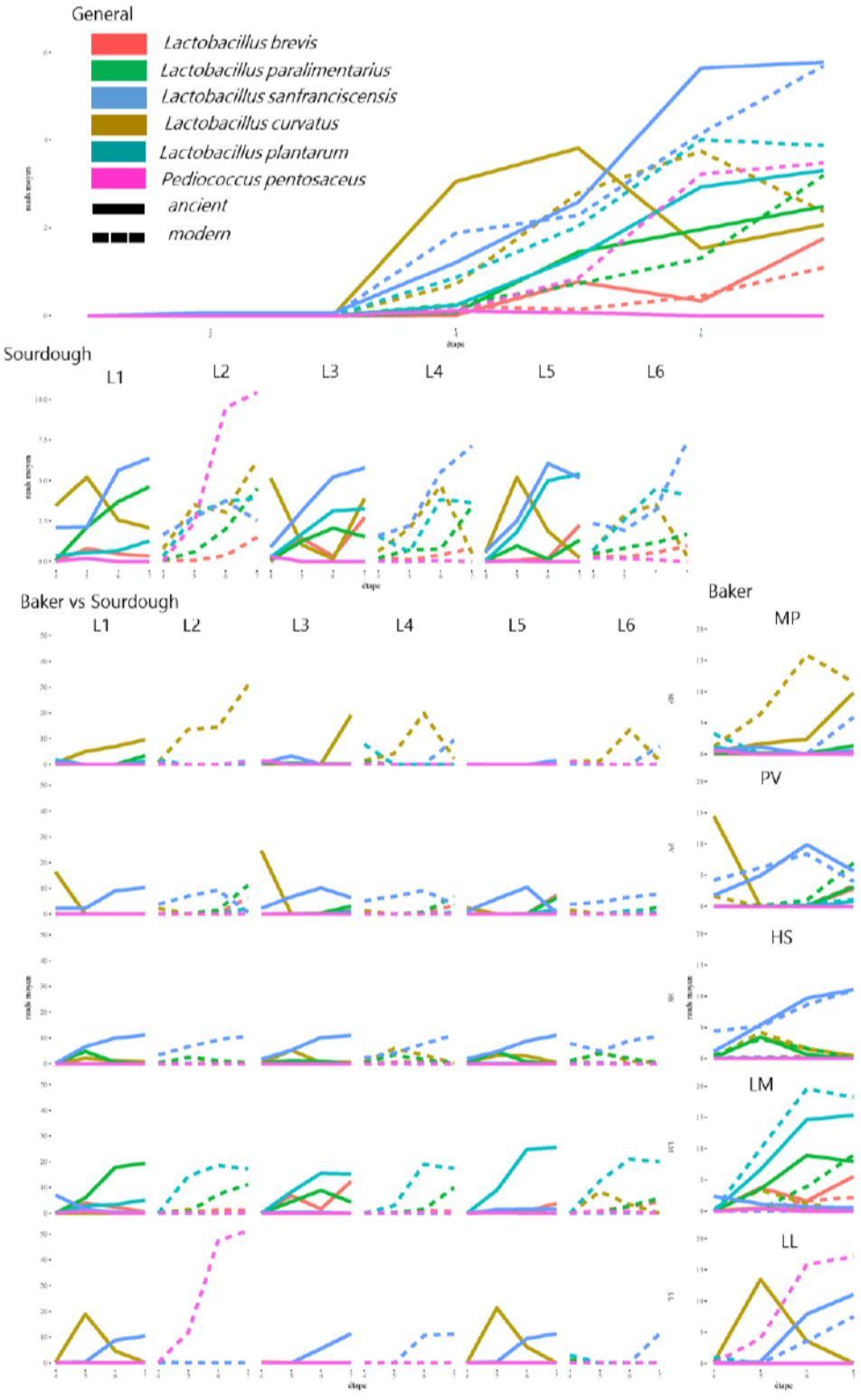


Figure 48. Figure 5B. Dynamic of lactic acid bacteria sourdough main species, e.g. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *L. brevis*, *L. paralimentarius*, *L. curvatus* and *Pediococcus pentosaceus* in sourdough J0, S1, S2, S3 for each baker (MP, PV, HS, LM) and lab sourdoughs (LL).

The dynamic per type of wheat varieties is indicated in line for ancient varieties and dashed lines for modern wheat varieties. Number of steps: Seeds (1), flours (2), sourdoughs J0 (3), sourdoughs S1 (4), sourdoughs S2 (5), sourdoughs S3 (6). At top is represented the global dynamic of those six species over time. In the middle is represented the dynamic per baker and at bottom the dynamic for each sourdough of each baker.

6. Baker, wheat varieties and terroir effect on fermentation related bread properties

We analysed the effect of terroir, of wheat varieties and of baker's origin of sourdough (hereafter also called baker's house effect or baker's effect) on different bread properties related to fermentation (bread heights and widths, density, acidity and sugar contents). A principal component analysis was carried out on all bread fermentation related variables as well as on LAB and yeast sourdough density. The first two axis explained 49% of the variation and clustered breads according to the bakers of origin of the sourdough (Figure 49). This axis was mostly explained by sourdough microbial density, glucose, glycerol and ethanol bread content, as well as bread density. The breads of the baker LM had finished their fermentation, and had a high quantity of ethanol and glycerol, but no more glucose. At the opposite, the breads of the baker HS had glucose, no glycerol and a low quantity of ethanol (Table 33). Over all variables, there was no clear evidence of differences between breads made with different wheat varieties or terroir. Heights of bread ranged from 3.4 to 7 cm, with a mean of 4.69 cm and widths between 8.30 cm and 12.70 cm, with a mean of 10.25. Density of breads were calculated between 0.27 g/cm3 to 0.53 g/cm3, with a mean of 0.41 g/cm3. The baker's origin of sourdough influenced significantly the heights, the widths and the bread density (Table 33,Table 32). The heights were also significantly affected by wheat varieties and the bread density and the widths by the terroir (Table 32).

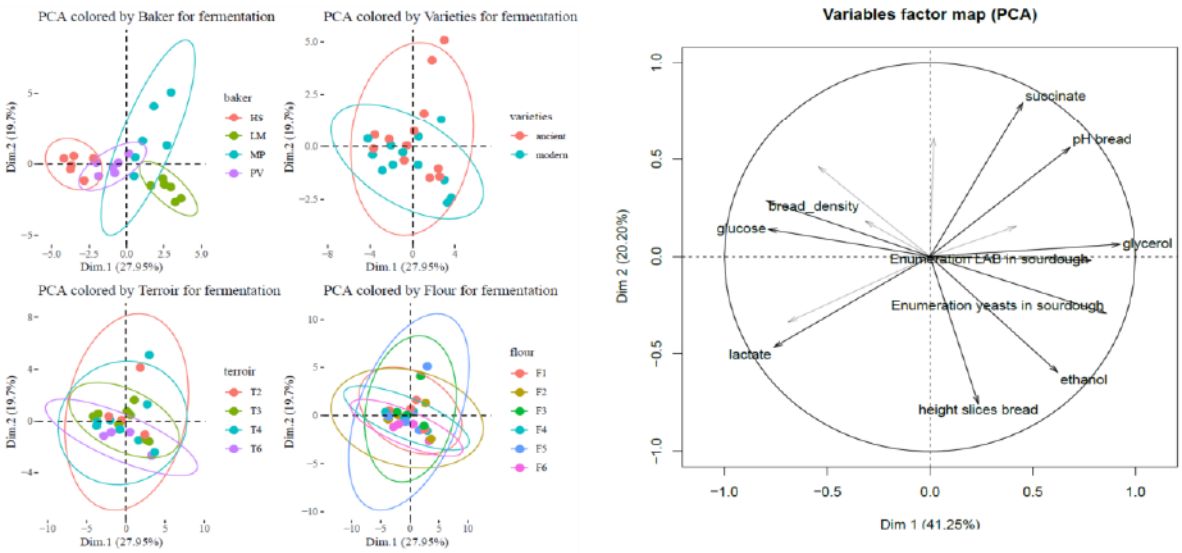


Figure 49. Principal Component Analysis on 14 fermentations variables

Enumeration sourdough LAB, enumeration sourdough yeasts, maltose, glucose, fructose, glycerol, ethanol, succinate, lactate, acetate, bread pH, bread Totale Titrable Acidity, width of bread slices, width slices bread, bread density). A) Samples colored by baker, HS (●), LM (●), MP (●) and PV (●). B) Samples colored by wheat varieties, ancient (●) and modern (●). C) Samples colored by terroir, T2 (●), T3 (●),

		Terroir	Wheat variety			Baker
	F-value	Pr (>F)	F-value		F-value	Pr (>F)
Acidity						
Breads pH	23,43	**0.0000179**	0,03	0,86	33,3	**3,50E-11**
Bread TTA	5,02	**0,03**	13,14	**0,0008**	17,15	**2,15E-07**
Sourdoughs LAB density	1,31	0,25	0,71	0,39	8,79	**2,87E-05**
Sourdoughs Yeast density	0,93	0,34	0,26	0,61	56,19	**2,00E-16**
Breads dimensions						
Bread density	25,13	**9,96E-06**	1,37	0,24	85,6	**2,20E-16**
Width bread slices	65,81	**3,90E-11**	3,65	**0,06**	10,24	**1,70E-05**
Height bread slices	5,59	**0,022**	62,25	**1,05E-10**	26,44	**7,59E-11**
Minerals						
Iron	0,65	0,43	5,09	**0,029**	1,78	0,17
Zinc	5,06	**0,029**	9,59	**0,003**	1,79	0,16
Calcium	1,46	0,23	38,97	**1,77E-07**	0,86	0,469
Magnesium	184,58	**2,20E-16**	7,81	**0,0078**	9,66	**5,66E-05**
Copper	0,12	0,73	46,78	**2,46E-08**	2,18	0,104
Potassium	0,02	0,88	123,59	**4,33E-14**	4,09	**0,01236**
Sodium	0,55	0,46	4,29	**0,045**	1,87	0,15
Phosphor	12,97	**0,0008**	7,36	**0,0096**	2,36	0,085
Bread organic acids and carbohydrates						
Glucose	2,36	0,13	0,26	0,61	486,25	**2,00E-16**
Maltose	13,54	**0,00065**	36,7	**3,27E-07**	17,2	**1,94E-07**
Fructose	0,02	0,89	1,52	0,22	13,259	**3,11E-06**
Lactate	4,14	**0,048**	1,33	0,26	12,52	**5,50E-06**
Acetate	3,11	0,085	4,87	0,033	6,98	**0,00065**
Succinate	0,64	0,42	7,22	**0,01**	8,31	**0,00018**
Glycerol	9,09	**0,004**	0,54	0,47	135,03	**2,20E-16**
Ethanol	3,32	0,075	4,95	**0,03**	27,77	**4,66E-10**

Table 32. Table 4. Results of linear model for Terroir 3 and 4 to test Terroir, Varieties and baker effects. F and pvalue indicated for each variable, e.g. acidity, breads dimensions, minerals, bread organic acids and carbohydrates

Concerning acidity, pH ranged from 3.86 to 4.15, with a mean of 3.95 and Total Titrable Acidity between 9.02 and 13.44 mL of NaOH 0.1N, with a mean of 11.38. The pH and Total Titrable Acidity varied significantly according to the baker's house. The sourdough LAB density ranged from 10^7 to 4.10^{10} Colony Forming Unit per gram of sourdough (CFU/g) with a mean value of $2.08x10^9$ CFU/g. The yeast density ranged from 4.10^5 to $3.11x10^8$ CFU/g of sample, for a mean of $4.48x10^7$ CFU/g (Table 33). The bacterial density depended on the baker's house and marginally on the wheat varieties (pvalue = 0.06) but did not seem to be linked with the number of backsloppings (Table 31). The baker HS (B3) made 9 backsloppings (Table 31) and sourdoughs had a very low LAB and yeast density (Table 33). The yeast density varied significantly according the baker's house with a strong interaction effect with the wheat varieties (Table 33). The concentration of maltose ranged from 1.65 to 6.82 g/kg of dry matter, glucose from 0 to 1.8g/kg, fructose from 0.1 to 1.2g/kg, glycerol from 0 to 0.5g/kg and ethanol from 0 to 0.4g/kg. The acid organics, succinate, lactate and acetate ranged from 0 to 7.0g/kg, from 0.1 to 0.56g/kg, from 0.08 to 0.43g/kg respectively (Table 33).

Bread	Flours	Terroirs	Varieties	Density LAB in sourdough			Density yeasts in sourdough			Maltose			Glucose			Fructose			Glycerol			Ethanol			Succinate			Lactate			Acetate		
B1L1	F1	T3	ancient	2,36E+09	±	2078367347	3,52E+07	±	6183333,33	2,62	±	0,01	0,30	±	0,00	1,13	±	0,04	0,29	±	0,01	0,10	±	0,00	0,18	±	0,00	0,98	±	0,01	0,15	±	0,00
B1L2	F2	T4	modern	1,90E+09	±	2024375000	7,73E+07	±	8250000,00	4,16	±	0,03	0,20	±	0,00	0,80	±	0,00	0,33	±	0,02	0,30	±	0,00	0,11	±	0,02	0,63	±	0,00	0,13	±	0,00
B1L3	F3	T2	ancient	6,14E+08	±	141250000	2,36E+07	±	3473469,39	3,11	±	0,02	0,20	±	0,00	0,70	±	0,00	0,39	±	0,01	0,00	±	0,00	0,52	±	0,01	0,69	±	0,00	0,36	±	0,00
B1L4	F4	T3	modern	4,54E+08	±	121250000	4,45E+07	±	5048000,00	3,55	±	0,03	0,10	±	0,00	0,30	±	0,00	0,45	±	0,04	0,20	±	0,00	0,11	±	0,01	1,20	±	0,01	0,38	±	0,00
B1L5	F5	T4	ancient	2,29E+09	±	2343333333	1,05E+08	±	102812500,00	5,52	±	0,07	0,40	±	0,00	0,50	±	0,00	0,40	±	0,01	0,00	±	0,00	0,69	±	0,01	0,58	±	0,01	0,43	±	0,00
B1L6	F6	T6	modern	3,01E+08	±	81250000	7,05E+07	±	2250000,00	3,59	±	0,02	0,00	±	0,00	0,10	±	0,00	0,33	±	0,02	0,20	±	0,00	0,00	±	0,00	1,05	±	0,01	0,36	±	0,00
B2L1	F1	T3	ancient	1,43E+09	±	1043750000	3,26E+07	±	6300000,00	3,10	±	0,02	0,13	±	0,04	0,40	±	0,00	0,30	±	0,00	0,17	±	0,04	0,10	±	0,00	0,89	±	0,53	0,34	±	0,00
B2L2	F2	T4	modern	1,03E+09	±	158125000	9,40E+06	±	1700000,00	6,76	±	0,08	0,20	±	0,00	0,90	±	0,00	0,10	±	0,00	0,10	±	0,00	0,00	±	0,00	1,21	±	0,01	0,11	±	0,00
B2L3	F3	T2	ancient	1,21E+09	±	183750000	3,98E+07	±	2750000,00	3,93	±	0,03	0,00	±	0,00	0,43	±	0,04	0,24	±	0,03	0,00	±	0,00	0,10	±	0,00	1,47	±	0,01	0,26	±	0,00
B2L4	F4	T3	modern	6,95E+08	±	165000000	2,01E+07	±	1025000,00	6,73	±	0,04	0,10	±	0,00	0,60	±	0,00	0,21	±	0,00	0,10	±	0,00	0,10	±	0,00	1,34	±	0,01	0,15	±	0,00
B2L5	F5	T4	ancient	1,53E+09	±	260625000	5,53E+07	±	12250000,00	4,72	±	0,06	0,00	±	0,00	0,40	±	0,00	0,19	±	0,00	0,10	±	0,00	0,10	±	0,00	1,28	±	0,02	0,14	±	0,00
B2L6	F6	T6	modern	7,11E+08	±	155625000	1,97E+07	±	3840625,00	5,53	±	0,03	0,20	±	0,00	0,50	±	0,00	0,13	±	0,02	0,10	±	0,00	0,00	±	0,00	1,22	±	0,01	0,23	±	0,00
B3L1	F1	T3	ancient	2,94E+08	±	79687500	1,10E+06	±	350000,00	3,41	±	0,01	1,60	±	0,00	0,70	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,10	±	0,00	1,35	±	0,01	0,21	±	0,00
B3L2	F2	T4	modern	3,94E+08	±	55102040,82	9,83E+05	±	416666,67	4,97	±	0,06	1,50	±	0,00	0,70	±	0,00	0,00	±	0,00	0,10	±	0,00	0,00	±	0,00	1,32	±	0,02	0,16	±	0,00
B3L3	F3	T2	ancient	4,80E+08	±	185000000	9,57E+05	±	61224,49	2,32	±	0,02	1,36	±	0,04	0,67	±	0,04	0,11	±	0,15	0,00	±	0,00	0,10	±	0,00	1,35	±	0,01	0,20	±	0,00
B3L4	F4	T3	modern	2,20E+08	±	42857142,86	1,43E+06	±	612244,90	4,52	±	0,06	1,77	±	0,04	1,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,07	±	0,04	1,53	±	0,02	0,20	±	0,00
B3L5	F5	T4	ancient	3,80E+08	±	50000000	1,52E+06	±	416666,67	3,03	±	0,03	1,30	±	0,00	0,70	±	0,00	0,00	±	0,00	0,07	±	0,04	0,00	±	0,00	1,34	±	0,01	0,18	±	0,00
B3L6	F6	T6	modern	3,25E+08	±	63750000	2,17E+06	±	600000,00	3,76	±	0,01	1,25	±	0,04	0,73	±	0,04	0,10	±	0,00	0,10	±	0,00	0,00	±	0,00	1,37	±	0,00	0,23	±	0,00
B4L1	F1	T3	ancient	1,66E+09	±	40000000	1,40E+08	±	65500000,00	2,02	±	0,01	0,00	±	0,00	0,20	±	0,00	0,38	±	0,01	0,30	±	0,00	0,10	±	0,00	1,10	±	0,00	0,16	±	0,00
B4L2	F2	T4	modern	2,86E+09	±	1166250000	1,45E+08	±	10250000,00	3,96	±	0,04	0,00	±	0,00	0,30	±	0,00	0,31	±	0,02	0,40	±	0,00	0,10	±	0,00	0,93	±	0,01	0,08	±	0,00
B4L3	F3	T2	ancient	1,74E+09	±	128437500	6,25E+07	±	7750000,00	1,66	±	0,01	0,00	±	0,00	0,20	±	0,00	0,32	±	0,02	0,10	±	0,00	0,11	±	0,01	1,06	±	0,00	0,20	±	0,00
B4L4	F4	T3	modern	2,19E+09	±	532812500	1,58E+08	±	11250000,00	3,47	±	0,04	0,00	±	0,00	0,30	±	0,00	0,45	±	0,00	0,20	±	0,00	0,12	±	0,01	1,11	±	0,01	0,10	±	0,00
B4L5	F5	T4	ancient	1,43E+09	±	312812500	1,12E+08	±	4750000,00	2,88	±	0,01	0,00	±	0,00	0,27	±	0,04	0,38	±	0,02	0,30	±	0,00	0,10	±	0,00	1,18	±	0,00	0,13	±	0,00
B4L6	F6	T6	modern	1,41E+09	±	193750000	1,14E+08	±	8000000,00	2,60	±	0,02	0,00	±	0,00	0,17	±	0,01	0,41	±	0,00	0,40	±	0,00	0,10	±	0,00	0,98	±	0,01	0,16	±	0,00

Table 33. Table S7. Microbial density of sourdough, organics acids and sugars of bread

Bread	Flours	Terroirs	Varieties	Fe		Zn		Ca		Mg		Cu		K		Na		P		pH_bread		TTA_per_g		width-slices-bread		height-slices-bread		Bread density	
B1L1	F1	T3	ancient	18,54	± 0,46	25,51	± 4,67	239,90	± 17,75	516,26	± 10,24	4,14	± 0,15	2177,66	± 34,42	6010,03	± 110,99	2212,74	± 124,51	4,61	± 0,00	7,39	± 0,34	12,20	± 0,35	3,93	± 0,08	0,39	± 0,01
B1L2	F2	T4	modern	16,52	± 0,51	26,41	± 5,28	305,79	± 34,62	605,70	± 17,84	3,72	± 0,05	2701,85	± 107,44	6431,21	± 199,49	2337,71	± 181,24	5,18	± 0,01	5,59	± 0,04	8,85	± 0,10	4,50	± 0,15	0,41	± 0,01
B1L3	F3	T2	ancient	20,29	± 0,41	28,90	± 5,99	221,02	± 19,48	555,43	± 18,26	4,53	± 0,06	2203,69	± 90,88	6008,48	± 124,73	2165,74	± 102,80	4,92	± 0,00	6,97	± 0,42	11,48	± 0,09	3,73	± 0,07	0,38	± 0,02
B1L4	F4	T3	modern	17,73	± 0,46	22,35	± 4,27	311,14	± 28,37	452,26	± 11,88	3,14	± 0,28	2564,02	± 94,88	6067,09	± 71,77	1866,01	± 71,76	4,29	± 0,01	8,21	± 0,50	11,70	± 0,05	4,00	± 0,05	0,42	± 0,01
B1L5	F5	T4	ancient	20,07	± 0,85	35,88	± 11,13	233,11	± 22,71	618,34	± 3,65	4,09	± 0,34	2316,08	± 76,88	6258,39	± 276,55	2340,54	± 110,26	5,05	± 0,01	6,61	± 0,07	10,33	± 0,08	3,58	± 0,04	0,44	± 0,00
B1L6	F6	T6	modern	17,03	± 2,92	23,91	± 8,41	287,21	± 24,63	534,33	± 8,49	4,34	± 0,21	2494,88	± 122,10	6317,03	± 83,61	2137,74	± 160,17	4,31	± 0,00	8,89	± 0,09	9,93	± 0,28	4,78	± 0,13	0,37	± 0,00
B2L1	F1	T3	ancient	17,28	± 1,46	28,14	± 9,58	244,81	± 11,16	502,71	± 11,28	4,20	± 0,27	2288,32	± 62,59	6240,16	± 62,78	2060,44	± 139,51	4,24	± 0,00	9,17	± 0,44	10,93	± 0,07	3,63	± 0,19	0,44	± 0,01
B2L2	F2	T4	modern	15,31	± 0,18	23,45	± 6,63	290,18	± 27,85	584,94	± 17,04	2,96	± 0,25	2621,23	± 82,74	6316,84	± 285,98	2130,44	± 111,01	4,32	± 0,01	7,55	± 0,15	9,28	± 0,44	4,75	± 0,23	0,50	± 0,01
B2L3	F3	T2	ancient	19,68	± 1,12	25,21	± 3,91	213,79	± 18,56	534,24	± 8,77	4,42	± 0,32	2089,87	± 53,58	5836,59	± 27,74	2014,06	± 132,78	4,28	± 0,00	7,93	± 0,02	10,53	± 0,04	4,35	± 0,10	0,40	± 0,01
B2L4	F4	T3	modern	17,10	± 4,36	17,02	± 4,47	301,56	± 19,58	456,09	± 6,46	3,09	± 0,18	2546,39	± 81,14	5883,56	± 179,90	1803,66	± 148,06	4,27	± 0,00	7,72	± 0,05	10,55	± 0,52	4,88	± 0,09	0,39	± 0,01
B2L5	F5	T4	ancient	19,92	± 3,65	28,68	± 3,19	232,80	± 25,02	603,75	± 5,38	3,84	± 0,42	2223,98	± 11,11	5905,78	± 155,94	2219,86	± 163,07	4,31	± 0,01	8,79	± 0,12	8,95	± 0,08	4,47	± 0,09	0,46	± 0,00
B2L6	F6	T6	modern	14,68	± 3,55	18,28	± 3,70	281,49	± 28,78	527,16	± 7,88	3,43	± 0,43	2437,94	± 65,61	5969,25	± 96,75	2031,40	± 124,73	4,20	± 0,00	9,24	± 0,35	9,38	± 0,23	5,25	± 0,20	0,45	± 0,00
B3L1	F1	T3	ancient	16,14	± 1,02	24,32	± 6,16	244,30	± 22,55	482,60	± 7,78	3,64	± 0,58	2208,41	± 59,02	6106,30	± 37,85	2033,44	± 191,77	4,22	± 0,01	8,99	± 0,02	10,58	± 0,09	4,43	± 0,13	0,52	± 0,01
B3L2	F2	T4	modern	15,57	± 1,14	20,68	± 5,13	288,59	± 30,46	572,25	± 4,32	2,90	± 0,27	2622,38	± 86,21	6216,30	± 80,06	2077,79	± 215,60	4,23	± 0,02	8,77	± 0,07	8,40	± 0,05	4,75	± 0,25	0,52	± 0,01
B3L3	F3	T2	ancient	20,67	± 1,45	21,79	± 1,64	220,86	± 9,28	547,32	± 3,19	5,03	± 1,04	2085,53	± 71,97	5615,08	± 253,43	2064,52	± 167,84	4,24	± 0,00	7,89	± 0,04	10,23	± 0,13	4,40	± 0,05	0,43	± 0,01
B3L4	F4	T3	modern	16,80	± 5,73	17,70	± 4,29	300,30	± 22,72	460,87	± 10,53	3,14	± 0,31	2623,30	± 162,85	6110,83	± 273,11	1832,18	± 132,30	4,14	± 0,00	8,83	± 0,12	9,80	± 0,05	4,38	± 0,08	0,47	± 0,01
B3L5	F5	T4	ancient	16,45	± 2,12	23,76	± 2,00	220,15	± 19,07	504,77	± 11,27	3,62	± 0,17	1955,57	± 28,80	5895,40	± 119,61	1965,14	± 121,36	4,18	± 0,01	9,16	± 0,40	8,90	± 0,10	3,93	± 0,08	0,51	± 0,00
B3L6	F6	T6	modern	13,29	± 0,14	17,39	± 1,63	285,89	± 20,89	563,20	± 16,45	3,84	± 0,35	2603,41	± 140,71	6007,63	± 218,16	2241,67	± 150,82	4,15	± 0,01	9,91	± 0,12	10,35	± 0,10	5,68	± 0,28	0,43	± 0,00
B4L1	F1	T3	ancient	16,61	± 0,98	22,79	± 1,10	239,13	± 20,76	513,57	± 7,31	3,97	± 0,21	2260,62	± 41,49	6109,15	± 81,78	2119,98	± 126,71	4,39	± 0,02	8,48	± 0,45	11,98	± 0,28	4,43	± 0,18	0,36	± 0,01
B4L2	F2	T4	modern	16,24	± 1,95	23,74	± 4,35	304,49	± 35,77	598,55	± 11,90	3,10	± 0,37	2672,12	± 75,47	6401,43	± 156,75	2097,44	± 210,07	4,57	± 0,00	7,37	± 0,36	11,35	± 0,45	6,63	± 0,19	0,37	± 0,01
B4L3	F3	T2	ancient	17,80	± 0,75	20,52	± 1,38	180,36	± 35,17	510,32	± 6,99	4,07	± 0,21	2054,88	± 44,70	5838,57	± 65,27	1990,91	± 161,59	4,40	± 0,01	6,99	± 0,41	11,18	± 0,34	5,58	± 0,23	0,27	± 0,00
B4L4	F4	T3	modern	12,20	± 2,39	17,51	± 4,35	351,44	± 67,80	488,16	± 16,50	2,66	± 0,63	2805,53	± 134,42	6585,35	± 441,37	1910,92	± 149,08	4,44	± 0,01	7,05	± 0,47	10,00	± 0,50	5,43	± 0,04	0,34	± 0,00
B4L5	F5	T4	ancient	17,77	± 1,35	27,21	± 2,31	251,51	± 31,82	656,22	± 12,49	4,11	± 0,14	2403,09	± 47,12	6161,28	± 42,32	2427,43	± 222,20	4,51	± 0,01	8,37	± 0,95	9,05	± 0,23	4,53	± 0,09	0,37	± 0,00
B4L6	F6	T6	modern	19,94	± 12,42	15,41	± 3,05	271,94	± 20,56	565,36	± 36,03	3,64	± 0,04	2675,91	± 141,99	6617,42	± 392,67	2205,47	± 124,81	4,44	± 0,01	7,40	± 0,37	10,20	± 0,20	6,50	± 0,25	0,30	± 0,00

Table 34. Table S8. Minerals, acidity and dimension of breads

7. Bread minerals content was mostly influenced by wheat varieties and terroir

We analysed the bread content of eight minerals (Table 34). Values of minerals' concentration are expressed in mg per kg of dry matter. The iron ranged from 10.27 to 38.57 (mean 17.23), zinc from 12.11 to 52.58 (23.19), calcium from 127.6 to 453.1 (263.4), magnesium from 438.4 to 666.4 (539.8), copper from 1.716 to 6.592 (3.734), potassium from 1929 to 3007 (2402), sodium from 5325 to 7247 (6121) and phosphorus from 1582 to 2702 (2095). The correlation table (Table S9) shows that the concentration of copper was anti-correlated with the concentrations of calcium, sodium and potassium (r>0.40, p-value=0, 0.0002 and 0 respectively), but was correlated with the concentration of phosphorus (r=0.4, p-value=0.0003). The concentration of calcium was correlated to the concentration of potassium (r=0.6, p-value=0) and sodium (r=0.5, p-value=0). The concentration of potassium was also highly correlated with the sodium concentration (r=0.68, p-value=0) and the concentration of phosphorus was correlated with the concentration in magnesium (r=0.49, pvalue=0). The principal component analysis on minerals content showed a clear bread clustering according to the type of wheat varieties used (Figure 50). Breads made with ancient wheat varieties contained significantly more copper, while breads made with modern wheat varieties contained significantly more calcium and potassium (Table 32). Terroirs had a significant impact on the bread concentration of magnesium and phosphorus (Table 32). Finally the bread magnesium content also changes significantly depending on the baker's origin of the sourdough (Table 32).

	Fe	Zn	Ca	Mg	Cu	K	Na	P
Fe		0.2 (0,0947)	-0.14 (0,2431)	0.22 (0,0671)	0.25 (0,0311)	-0.19 (0,1112)	0.1 (0,3955)	0.03 (0,8263)
Zn	0.2 (0,0947)		-0.43 (0,0002)	0.37 (0,0012)	0.41 (0,0004)	-0.11 (0,3792)	-0.03 (0,8215)	0.11 (0,3478)
Ca	-0.14 (0,2431)	-0.43 (0,0002)		-0.1 (0,3999)	-0.66 (0)	0.6 (0)	0.5 (0)	-0.07 (0,5378)
Mg	0.22 (0,0671)	0.37 (0,0012)	-0.1 (0,3999)		0.16 (0,1694)	0.15 (0,2144)	0.28 (0,0158)	0.49 (0)
Cu	0.25 (0,0311)	0.41 (0,0004)	-0.66 (0)	0.16 (0,1694)		-0.5 (0)	-0.43 (0,0002)	0.42 (0,0003)
K	-0.19 (0,1112)	-0.11 (0,3792)	0.6 (0)	0.15 (0,2144)	-0.5 (0)		0.68 (0)	-0.04 (0,7203)
Na	0.1 (0,3955)	-0.03 (0,8215)	0.5 (0)	0.28 (0,0158)	-0.43 (0,0002)	0.68 (0)		0.07 (0,5804)
P	0.03 (0,8263)	0.11 (0,3478)	-0.07 (0,5378)	0.49 (0)	0.42 (0,0003)	-0.04 (0,7203)	0.07 (0,5804)	

Table S9. Correlation matrix of minerals data (Fe, Zn, Ca, Mg, Cu, K, Na, P) and p-value associated

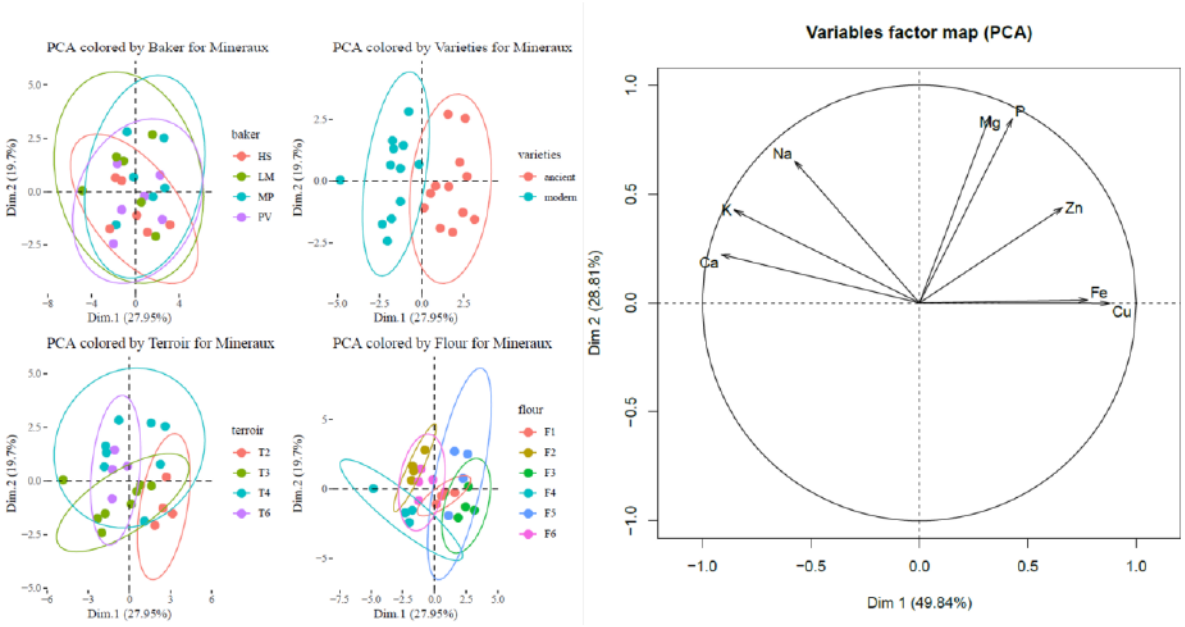


Figure 50. Figure 7. Principal Component analysis on minerals variables (Fe, Zn, Ca, Mg, Cu, K, Na, P).

A) Samples colored by baker, HS (●), LM (●), MP (●) and PV (●). B) Samples colored by wheat varieties, ancient (●) and modern (●). C) Samples colored by terroir, T2 (●), T3 (●), T4 (●) and T6 (●). D) Samples colored by flours, F1 (●), F2 (●), F3 (●), F4 (●), F5 (●) and F6 (●). E) PCA Variables on Axis 1 (49.84%) and Axis 2 (28.81%).

8. Bread aromas profils were mostly impacted by the baker's origin of sourdough and the wheat terroirs

The volatiles compounds identified are presented in Table 3. They belong to aldehydes, alcohols, ketones, furans, esters, lactones, pyrazines, terpenes and the compounds. The aromas profil were mostly structured according to the wheat terroir and to the bakers of origin of the sourdough (Figure 51). Terpenes compounds (menthen-4-ol, β-ocimene, terpinolene, linalool, δ-cardinene, α-terpineol, citral, geraniol, geranyl acetate, β-pinene and limonene) were only found in breads made with flours from Terroir 3. The compound 3-methyl-1-butanol was found in higher proportion in breads from Terroir 4 and from modern wheat varieties than in Terroir 3, 2, 6 and in ancient varieties. The compound 5-methylfurfural was described more in modern varieties than in ancient varieties. Finally, compounds 2-heptanal, hexanol, nonanal, 3-octen-2-one, 1-octen-3-one, 2-pentyl-furan were found in higher concentration in breads made with sourdoughs of the baker PV; 5-methylfurfural, 2-acetyl-furan, 5-methylfurfural in breads made with sourdoughs of the baker MP; nonanal in breads made with sourdoughs of the baker LM and 2-pentyl-furan, furfuraldehyde, 1-octen-3-one, 3,5-octadien-2-one in breads made with sourdoughs of the baker HS.

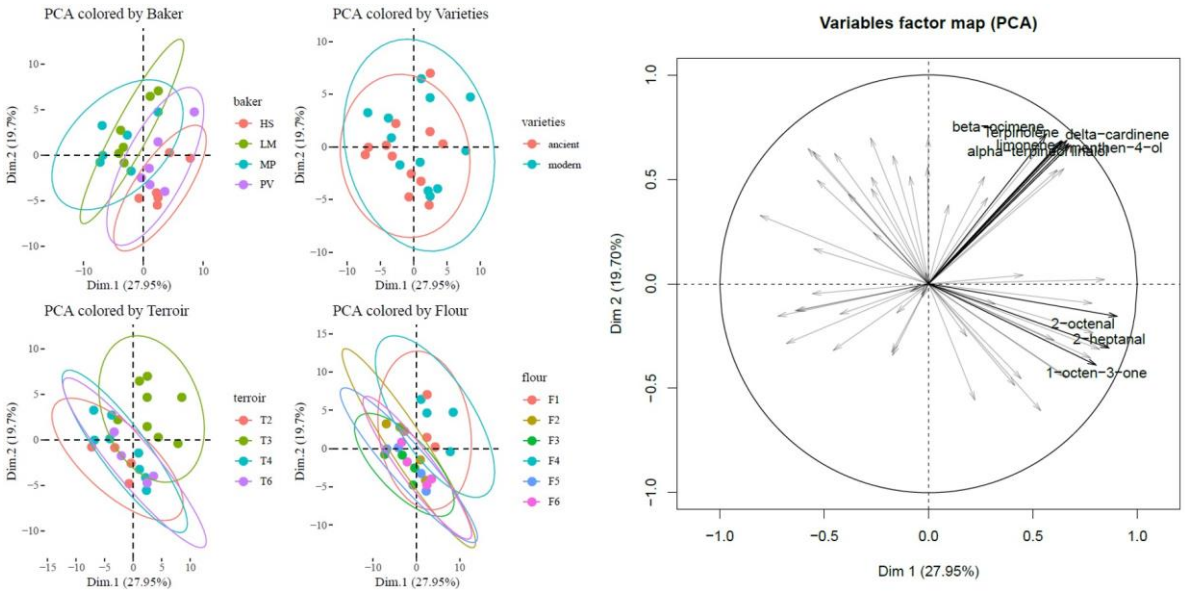


Figure 51. Figure 8. Principal Component Analysis on 39 volatils compounds.

A) Samples colored by baker, HS (●), LM (●), MP (●) and PV (●). B) Samples colored by wheat varieties, ancient (●) and modern (●). C) Samples colored by terroir, T2 (●), T3 (●), T4 (●) and T6 (●). D) Samples colored by flours, F1 (●), F2 (●), F3 (●), F4 (●), F5 (●) and F6 (●). E) PCA Variables on Axis 1 (27.95%) and Axis 2 (19.70%).

9. Bread sensorial perception and its link to other bread properties

Sensorial profile of the breads was determined with descriptors in Table 3. The sensorial analysis was realized with 16 breads from two terroirs, T3 and T4 where the farmers had grown both modern varieties and landraces. The sensorial profile could be associated to the wheat varieties and to the sourdough's baker house. A multiple factor analysis including sensorial analysis but also bread carbohydrate, organic acid and minerals content data revealed that the long finish was correlated with a high concentration in succinate and acetate, with a roasted and malt taste, and with the concentration in zinc, copper, iron and phosphorus (Figure 52). Breads with high concentration in ethanol were perfumed and aromatic, fruity and acid. The descriptor lactic, soft was correlated with the concentration of lactate and linked with the concentration of potassium and calcium. Breads with a high concentration in sodium, maltose, glucose, fructose were buttered, brioche, with a taste of caramel and cereals. The first axis of the MFA clustered bread according to the baker's origin of sourdough. The breads made with HS sourdoughs were perceived as more acidic, fruity while at the opposite, the ones made with PV sourdoughs were

perceived as having a taste of caramel and butter (Figure 52). The second axis of the MFA distinguished bread according to their wheat varieties. The breads made of ancient wheat populations were characterized by a long taste, a roasted malt taste and had higher content in acetate and succinate while the breads made of modern varieties had more lactate.

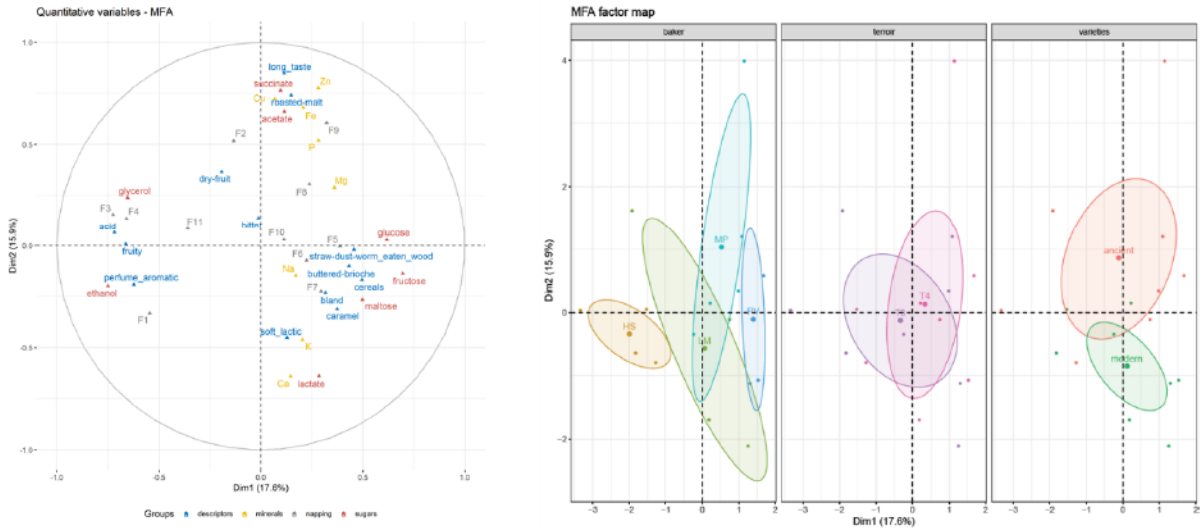


Figure 52. Figure 9. Multiple factor analysis with breads made with wheat varieties grown on Terroir 3 (T3) and Terroir 4 (T4).

A) Variables of sensorial descriptors (●), carbohydrates (●), organic acids (●), minerals data (●) and Correspondence Analysis Napping results (●). B) MFA factor map with confident ellipses (95%) for factors baker, terroir and varieties.

Family Name	N°C A S	Supposed origin
Aldehydes		
hexanal	66 25 1	Lipids β-oxydation
Benzaldehyde	100 52 7	Plant
2-heptenal	111 71 7	Plant
nonanal	124 19 6	Plant
2-octenal	2548 87 0	Plant
5-ethyl-formylcyclopentene		
2,4-heptadienal		Lipids β-oxydation
Furfuraldehyde	98-01-1	Maillard reaction
5-methylfurfural	620-02-0	Maillard reaction
Alcohols		
1-octanol	111 87 5	Plant
Phenylethyl-alcool	60-12-8	Fermentation
1-phenoxypropan-2-ol	770-35-4	
linalol	78-70-6	Plant
Ketones		
3-octen-2-one	1669 44 9	Plant, fermentation
1-octen-3-one	4312 99 6	Plant, Lipids β-oxydation
3,5-octadien-2-one	38284 27 4	
Furans		
2-acetyl-furan	1192 62 7	Maillard reaction
2-pentyl-furan	3777 69 3	Maillard reaction
5-pentyl-5-furan-2-one		Maillard reaction
Esters		
Ethyl-octanoate	106 32 1	Fermentation
Lactones		
Nonalactone	104 61 0	Lipids β-oxydation
Pyrazines		
2-methyl-pyrazine	109 08 0	Plant
2-ethylpyrazine	13925 00 3	Plant
Terpene		
β-ocimene	13877-91-3	Plant
B-pinene	80 56 8	Plant
limonene	138 86 3	Plant
Terpinolene	586-62-9	Plant
Alpha-terpineol		Plant
geraniol	106-24-1	Plant
geranyl-acetate	105-87-3	Plant
delta-cadinene	483-76-1	Plant
citral	141-27-5 ou 106-26-3	Plant
menthen-4-ol	470-65-5	Plant

Table 35. Table 2. List of volatiles compounds in wheat sourdough bread. The compounds are classified by family, CAS number is indicated, their supposed origin

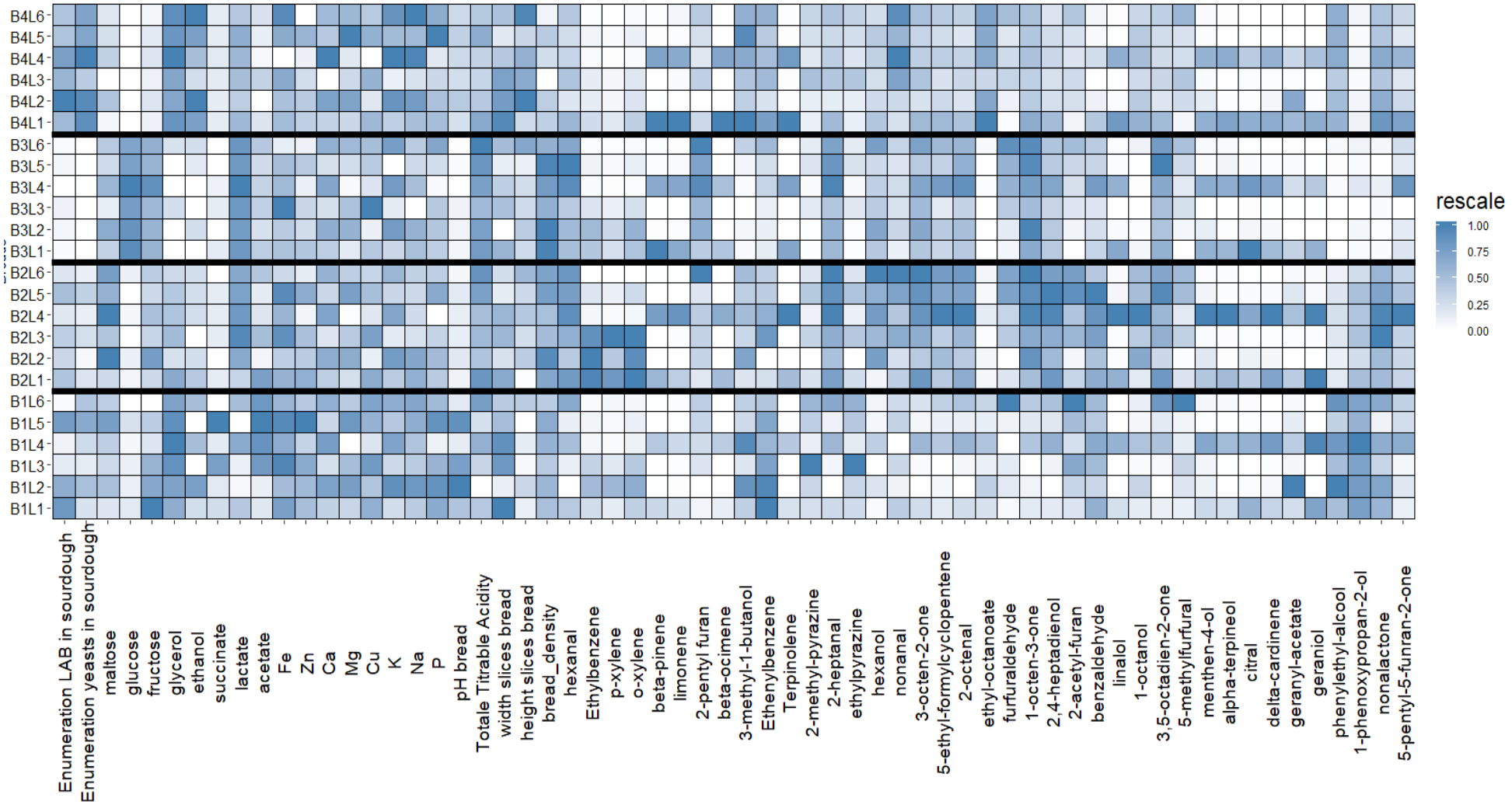


Figure 53. Map for each bread

Map to describe each bread for the LAB and yeast density, carbohydrates, organics acids, minerals, acidity, bread dimensions and volatils compounds

Discussion

In this study we analysed the seed, flour and sourdough microbiota to get more insight into the origin of sourdough microbiota. We found that except for *L. sanfranciscensis* that could arrive in sourdough through the flour, sourdough microbiota mostly come from the house environment and/or the bakers. Microbial community of fermented products have already been shown to come from the artisans' environment, utensils, jars, dishes, worktable (Bokulich and Mills, 2013; Franz et al., 2014; Minervini et al., 2014; Tamang et al., 2016). It has been described for cheese (Gobbetti et al., 2018; Irlinger et al., 2015), in artisanal cheese (Bokulich and Mills, 2013) and in hard cheeses (Quijada et al., 2018). This results were found for cheese, where environmental organisms detected in processing environments dominated the surface microbiota and the existence of facility-specific, house microbiota, which may play a role in shaping site-specific product characteristics (Bokulich and Mills, 2013). A study in 2015 showed that no detectable microorganisms were found in walls and air samples. LAB were the dominant bacteria of the house microbiota, especially in dough mixer and yeasts contaminated at higher level both storage box and dough mixer (Minervini et al., 2015a)

It has also been found for a Chinese fermented liquor where the environmental microbiota has been shown to be an important source of micro-organisms (Wang et al., 2018). In sourdough, the analysis of the bacteria diversity revealed that the house microbiota has an important place in the sourdough microbiota installation (Minervini et al., 2015b). Here we show that the house microbiota is also the main source of sourdough yeasts and that the common sourdough bacteria, *L. sanfranciscensis* could also come from the flour. The milling crushed the seeds, the envelop grain: some microorganisms are inevitably lost. However, the milling could disseminate the filamentous fungi by breaking their filaments, or disseminate species present inside the seed and in the envelop. *Schizosaccharomyces japonicus* and *Lactobacillus sanfranciscensis* were found in flours, but not in the seeds by a macerate detection approach, leaving the question of their origin open. The species *Trichosporon coremiiforme* was described from the flours' ecosystem and was described previously from soil and human skin: showing the ubiquiste nature of germs and the possible dissemination all along the food chain thanks to milling equipment, operators hands and many other vectors.

The microbiota of sourdough could be shaped by supplementary ingredients added by the baker, as hop, honey, mature fruits, grapes, salt, sugar, vinegar (Minervini et al., 2014). Water is not actually considered as a reservoir of bacteria (Gobbetti et al., 2016). However,

studies should be made to test for this hypothesis, since many bakers mentioned the possible impact of water on sourdoughs, dough rheology, or bread shelf-life . Finally, insects could be a reservoir of yeasts and LAB. *Lactobacillus sanfranciscensis* has been detected in faecal samples of insects *Tribolium castaneum* and *Trobilum confusum* and this could be related to the occurence of *L. sanfranciscensis* in sourdough (Boiocchi et al., 2017). In addition, drosophila microbiota analysis revealed the presence of yeast species also found in sourdough, *Candida parapsilospsis*, *Candida stellata*, *Kluveromyces marxianus*, *Lachancea kluveri*, *Pichia fermentans*, *Pichia membranifaciens*, *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* (Carbonetto et al., 2018; Stefanini, 2018).

1. Microbial community flux and selection along the bread-making food chain

A microbial flux from seeds to sourdough was observed for fungi. A limited“core community” was found in seeds, flours and sourdough ecosystems including *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Mycosphaerella tassiana* for *Ascomycota* and *Vishniacozyma victoriae*, *Udeniomyces pyricola*, *Itersonilia panonnica* for *Basidiomycota*. However, the abundance of these species changed under the selection by the sourdough environment. Sourdough environments give advantage to the fungi belonging to the phylum *Ascomycota* after the sourdough initiation. Except for *Kazachstania australis* only found in the flour and *Kodamaea ohmeri*, species of *Kazachstania* and *Saccharomyces* genera appear during the first week of sourdough initiation (J0, S1 samples), and increased in frequency in sourdough over the weeks. This result suggested selection of yeast species adapted to the sourdough environment . The selected species depends on the bakers regardless of the origin of the flour. Indeed, each baker had a different sourdoughs yeast species composition. This strengthens the hypothesis that the fungal dominant community is structured by the house microbiota, i.e. from the air, the bakery, the utensils, the hands of the baker, rather than by the flour used by the baker.

Only few bacteria species found in seeds were also found in flours and sourdoughs. This was the case for the species *Pantoea agglomerans*. However, its abundance decreases drastically from the seeds (56% of the total OTU) to the mature sourdough S3 (5%). Similar results were found in previous studies where *Proteobacteria* were the most represented phylum in flour (Ercolini, 2013; Lattanzi et al., 2013), but don’t disappeared in sourdoughs. Here, the characterization of the bacterial microflora of the flour had been arduous because of the overcrowding of mitochondrial sequence. The number of bacteria reads per sample ranged from

687 and 12450.However, despite this low coverage, a high species diversity was found in flour compared to seeds or sourdough (Figure S4) .The method to analyse flour microbiota need to be further developed, by thinking how to avoid wheat mitochondrial sequences. An increase of OTUs assigned to the genus *Lactobacillus* was observed after the initiation of the sourdough to the final sourdough, from 15% at J0 to 87% of relative abundance in final sourdough. Many species of *Lactobacillus* were already found after one week of backsloppings, e.g. *L.brevis*, *L.collinoies*, *L.crustorum*, *L.curvatus*, *L.fuchuensis*, *L.oryzae*, *L.paralimentarius*, *plantarum*, *L.sanfranciscensis*, *L.spicheri*, *L.xiangfangensis*, etc. However, only *L. sanfranciscensis*, *L. curvatus*, *L. paralimentarius* and *L. plantarum* became dominant after three weeks of backslopping.

2. A specific dispersion and selection dynamic for *L. sanfranciscensis*

The species *L. sanfranciscensis* is described as the dominant lactic acid bacteria (LAB) species in the sourdough all over the world (De Vuyst et al., 2014, 2017; Siepmann et al., 2017). We found it in 23 out of 24 flours samples as a single OTU with an average of relative abundance of 1.2%. This OTU became dominant in sourdoughs for three out of four bakers. Interestingly, other *L. sanfranciscensis* OTUs, probably coming from the house microbiota, were also present in these sourdoughs but the one found in flour dominated in mature sourdough after three weeks of backsloppings. For mature sourdoughs S3, the medium MRS with maltose and cysteine used in culture-based method didn't permit to detect *Lactobacillus sanfranciscensis* in each sourdough. *L. sanfranciscensis* was found in 5 on 6 lab sourdoughs, *Pediococcus pentosaceus* dominating the last sourdough. *Lactobacillus sanfranciscensis* contaminates the environment and the practices of the baker should contaminate all the bakery. It was described recently that LAB population dynamics in artisanal sourdoughs over one year of daily propagations was driven mainly by flour microbiota (Minervini et al., 2018b). The species could be present inside the seed or in the seeds envelops. LAB are endophytic in durum wheat flour according to a previous study (Minervini et al., 2015a). The *Lactobacillus* species are well-adapted to the sourdough medium and so are able to grow and use resources of the flour (Gobetti et al., 1994; Van Kerrebroeck et al., 2017). The species *Lactobacillus sanfranciscensis* may be present in the soil, in the seed, as endophytic bacteria (Minervini et al., 2018a) or in the mill.

3. Backslopping practices: a good model to study the dynamic and adaptation of microbial community during ongoing domestication

Bakers made between 5 to 10 backsloppings during the three weeks of experimentation. After 10 backsloppings for the baker LM (Table S2), the six sourdoughs initiated and maintained for three weeks with the six different flours had the same dominant species, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum*. This result was observed for the other bakers, but less marked maybe due to the lower number of backsloppings. Indeed, the sourdoughs of the baker MP, who only made five backsloppings, had a higher number of species per sourdough and different microbial communities depending on the flour. This result suggested that a mature sourdough with a stable ecosystem, needs ten backsloppings and approximately three weeks to be stabilized in baker's house. By contrast, the sourdoughs made at the laboratory were not stabilized, if we considered the high species diversity, despite the high number of backsloppings (n=13). This observation confirmed the key role of bakery environment in microbiota installation. It revealed that sourdough could be a good model to study microbial community domestication in action over time since selection occurs quite rapidly.

4. What makes a sourdough stable: some perspectives

Once mature, the stability of the sourdough microbiota may depend on several factors.

i) It may depend on the practices of the baker, how he manages his sourdoughs, the temperature of the room where he stores the sourdoughs and on house microbial composition, e.g., of utensils, in bakery and on baker's hands. Indeed, the practices of the bakers influence the yeast diversity (Michel et al., unpublished, Urien et al en révision) and LAB (Minervini et al., 2012). The repeated process of sourdough bread-making by one artisan may participate to the stability of the sourdough microflora. A study showed that the farming system is undoubtedly another determinant able to affect flour microbiota (Rizzello et al., 2015).

ii) The stability of sourdough microbiota over time could also be related to the presence of intra-specific microbial diversity. The intraspecific diversity represent a potential for selection and may give an adaptive advantage to the sourdough microbial populations (Vogel et al., 2011). Indeed, we found here 28 *L. sanfranciscensis* OTUs. From 2 to 7 OTUs co-occurred in the same sourdough revealing within sourdough genetic diversity. Intraspecific *L. sanfranciscensis* diversity was also detected in previous studies and may differed between

sourdoughs made with conventional flours and organic sourdoughs, or according to other factors such as baker's practices (Lhomme et al., 2016b). Intraspecific sourdough diversity was also detected for yeast. Here we found that several OTUs co-occurred in sourdough for *K. bulderi*, *S. cerevisiae* or *W. anomalus*. Additional research should be done to better understand the evolutionary processes that shape this genetic diversity.

iii) The stability of the sourdough microbiota may also depend on microbial interactions between LAB and yeast species. In sourdough, we suppose the existence of both facilitation (positive-positive) and competition (negative-negative). The best-characterized mechanism of interaction is a positive interaction between some yeasts and bacteria relying on cross-feeding (Hittinger et al., 2018; Ivey et al., 2013; Sieuwerts et al., 2018). The crossed food includes the metabolites or waste from a species for another species (Seth and Taga, 2014). For instance, lactic acid bacteria may hydrolyse the maltose in glucose for strains of *Kazachstania* that are not able to consume maltose (De Vuyst and Neysens, 2005; Gobbetti, 1998; Venturi et al., 2012). By contrast, negative interaction, like competition,, may disadvantage some species. In some cases, the interaction of LAB and yeast strains was shown to be strain-dependent (Vogelmann and Hertel, 2011, Ramsayer et al. Unpublished). Other mechanism of LAB/ yeasts interaction rely on the production and release of compounds which are not nutriments, but able to modify the physico-chemical properties of the environment in the advantage or disadvantage of certain species. For example, species of lactic bacteria are known to produce antibiotics or protein bacteriocins (Crowley and al., on 2013; Of Vuyst and al., on 2009; Joerger, on 2003). Some strains of *Saccharomyces cerevisiae* are known to produce compounds with antibacterial activities (Al-Jassaci et al., 2016; Osborne and Edwards, 2007).

iv) Finally, the sourdough microbiota may be stabilized by the sourdough physico-chemicals characteristics. Sourdough is fermented and maintained thanks to regular backsloppings to allow pH by the growth and metabolic action of mainly lactic acid bacteria and yeasts (Van Kerrebroeck et al., 2017). The concentration of organic acids is also a parameter that avoid non-adapted species occurrence. The acetic acid and the lactic acid produced by the lactic bacteria and the yeasts can exclude or inhibit the growth of the "not lactic" bacteria and the fungal contaminants by lowering the pH of the environment (Gobbetti, 1998).

5. The bread organoleptic and nutritional profile, from the farm to the fork

We showed that the bread nutritional and organoleptic quality is the result of an interaction between sourdough, wheat varieties and terroir. It highlights the need of analysing agri-food chain to better understand and control the component of food quality.

As expected, bread density, size and sugar content depend mostly of sourdough microbiota. Sourdoughs of the baker LM had the species *L. plantarum* and *S. cerevisiae* and a high microbial concentration, 2.10^9 and 10^8 CFU/g for bacteria and yeasts respectively. The breads made with those sourdoughs have a high quantity of ethanol and glycerol, no more glucose, had the highest bread density and a high concentration in ethyl-octanoate and nonanal. It is a scheme of a finished fermentation. On the opposite, sourdoughs of the baker HS had the species *L. sakei*, *L. heilongjiangensis*, *K. servazzi* and *S. cerevisiae* and a low population density of yeasts ($1.36x10^6$) and bacteria ($3.5x10^8$). The breads had glucose, no glycerol, a low quantity of ethanol and less compounds like methyl butanol, phénylethyl alcohol, from the yeasts Erlich pathway, that uses amino acids liberate by proteolytic activity (Gänzle and Ripari, 2016). It agreed with the study of Aslankoohi et al (2015) their data suggest that a high glycerol production level contributes to optimal dough fermentation and dough development. The breads characteristics clustered depending on the sourdough but also on the wheat varieties. The damaged starch concentration and intrinsic gluten proteins quality may changed with the varieties and may affect the flour characteristics and the functioning of the sourdough microbiota.The bread height for exemple was dependent of the wheat varieties and may be related to the capacity of the dough to structure the gluten network and to retain the CO_2 (Aslankoohi et al., 2015). We showed that wheat terroir is a driver of bread aroma profile. The terroir is known for influencing arome profil, especially for wine (Bokulich et al., 2014). Why not for organic sourdough bread ? Previous studies have clearly demonstrated that sourdough also positively affects the sensory, nutritional and functional properties of baked goods (Gobbetti et al., 2014; Rizzello et al., 2015). Here we confirmed these findings. Is there a sourdough microbial consortium coming from the terroir of wheat varieties that have an impact on bread specific characteristics or specific biochemical compounds? The PCoA with weighted-Unifrac distance didn't show any clear link between terroir or wheat varieties and sourdough microbiota (supp data). However, rare microbial species coming from the terroir might play a functional role that could not easily be detected. In addition, terroirs may have an impact on the seed biochemical composition and may play indirectly a role in sourdough microbial species functional diversity. Volatiles compounds in the bread made with sourdough was reviewed

recently (Pétel et al., 2017). Here, the volatile compounds linked with one specific terroir were the menthen-4-ol, geraniol, geranyl acetate, delta cardinene, citral and alpha terpineol compounds. Those compounds may be produced as defensive strategy by the plant and therefore be linked to agronomic practices, the use of natural insecticide, adventitious presence or the environmental conditions which can stress the plant.

In addition, breads made with ancient wheat varieties contained significantly more copper and zinc, while breads made with modern wheat varieties contained more calcium and potassium. Interestingly, the bread minerals content appeared to be associated to different consumer perception. The minerals could play a role in the microbial interaction in the microbial consortia, by exchange or competitions. It could have an impact on the aroma profile of the bread and fermentation.

Conclusion

The fermented-food production chain is a good model to study the ecology and evolution of microbial communities. The backslopping practices are a worthy model to study the dynamic and adaptation of microbial community during ongoing domestication. Our study revealed a microbial flux from the seed to the mature sourdough for yeasts and bacteria. However, the house microbiota and the flours appear to be the main factors driving sourdough dominant microbial diversity. The bread properties resulted from interaction between terroir, wheat varieties and baker's house microbiota. It highlights the need of analysing agri-food chain to better understand and control the component of food quality. Overall, we showed a strong baker's house microbiota effect, proving the need of preserving local food chain with diverse and numerous bakeries houses for maintaining microbial diversity and diversifying food supply.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from ANR Bakery–13-ALID-0005 (French National Research Agency), INRA and Oniris. We thank for their kind and precious collaboration, farmers and bakers and scientifics of the project.

Chapitre V. Diffusion des connaissances à destination d'un public large

A. La recherche participative, des échanges de savoir

La recherche participative, comme mode de production des savoirs permet la démocratisation de la science. Elle propose un échange entre savoirs paysans, locaux et savoirs scientifiques (Table 36). Elle émerge d'une co-construction du savoir entre chercheurs institutionnels et société civile/groupe de citoyens. D'après la Fondation Sciences citoyennes en mai 2010, la recherche participative peut être définie comme une recherche conduite suivant un partenariat égal entre un partenaire académique (laboratoire, chercheur) et un partenaire de la société civile (associations, ONGs, groupes d'habitants, etc.). L'objectif dans ce type de partenariat est de produire des connaissances qui, à la fois, constituent un réel intérêt scientifique pour le chercheur et répondent également aux besoins du partenaire (https://sciencescitoyennes.org/formation-fsc-recherche-participative-aruc-picri-boutiques-de-sciences/, voir PDF).

	Recherche participative	Recherche conventionnelle
A quoi sert la recherche ?	Action	Comprendre, avec peut-être une action plus tard
Pour qui est la recherche ?	Personnes locales	Intérêts institutionnels, personnels, professionnels
Pour qui la connaissance compte-t-elle ?	Les personnes locales et les scientifiques	Les scientifiques
Qui influence les sujets choisis ?	Les priorités locales	Les agendas institutionnels, les intérêts professionnels, les priorités de financement
Pourquoi la méthodologie choisie ?	Emancipation, apprentissage mutuelle	Conventions disciplinaires « Objectivité» et « vérité »
Qui prend part dans les étapes du processus de recherche ?		
Identification du problème	Les personnes locales	Chercheur
Collection des données	Les personnes locales	Chercheur, recenseur
Interprétation	Structures et concepts locaux	Structures et concepts de la discipline
Analyses	Personnes locales	Chercheur
Présentations des résultats	Accessible localement et compréhensible	Par le chercheur pour un organisme de financement ou d'autres chercheurs
Action sur les résultats	Intégré au processus	Séparé
Qui agit ?	Les personnes locales, avec ou sans un support externe	Agences externes
Qui possède les résultats ?	Partagés	Les chercheurs
Qu'est-ce qui est souligné ?	Le processus	Les résultats

Table 36. Comparaison de la recherche participative et conventionnelle, adapté de Cornwall and Jewkes, 1995

« Les formes de la recherche participative sont multiples mais elles présentent toutes un point commun : la prise en compte assumée, à des degrés variables, de savoirs non académiques.»

Extrait de la présentation de la journée d'étude « Recherche participative et gestion des ressources naturelles » (Lyon, 4 mai 2011), organisée par Frédérique Jankowski et Joëlle Le Marec

La recherche entraîne des transformations sociales, politiques, éthiques et juridiques. L'implication d'acteurs non académiques dans le processus de recherche permet de proposer des espaces de validation et de discussion de savoir (https://sciences-critiques.fr/promouvoir-la-recherche-participative/). Les recherches reconnaissent et incluent des savoirs issus des participants (savoirs expérientiels, connaissances tacites, traditions, astuces, etc.) (Lechopier, 2013). Les scientifiques reconnaissent les savoirs locaux et les savoirs scientifiques légitimés par les acteurs locaux.

Une mission sur les sciences participatives, qui associent les citoyens aux chercheurs, a été confiée en 2015 par le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche à François Houllier, alors PDG de l'Inra et Président de l'Alliance nationale de recherche pour l'environnement, afin d'en favoriser le développement (http://www.sciences-participatives.com). Les sciences participatives sont alors une opportunité à saisir et à appréhender sur le long terme avec 3 grands types d'action.

1) Agir aujourd'hui pour en tirer profit, multiplier et diversifier les données, diversifier les ressources pour la recherche, diffuser les savoirs scientifiques, etc. Et agir aujourd'hui pour rendre les sciences participatives plus sûres et plus justes, plus efficientes et plus impactantes : réflexion éthique, diffusions des techniques de participations, augmentation de la visibilité pour les porteurs de projets et les participants, etc.

2) Pérenniser les sciences participatives afin de fidéliser les participants citoyens et chercheurs (accompagner la formation, favoriser la reconnaissance des savoirs des citoyens, etc.) et suivre les projets et dispositifs (amélioration de la visibilité du projet, assurer le financement, etc.)

3) Se préparer pour demain anfin de développer le numérique et anticiper les évolutions

B. Le projet BAKERY

Le projet ANR BAKERY est un projet de recherche fondé sur la participation et collaboration d'équipes INRA, d'Universités, de l'Institut Technique d'Agriculture Biologique, du Réseau Semences Paysannes et de plus de 40 boulangers/paysans-boulangers (Figure 54, Figure 55, Figure 56). Nous y étudions la diversité et les interactions d'un écosystème agro-alimentaire 'Blé/Homme/Levain' à faible intrant pour mieux comprendre la durabilité de la filière boulangerie. Un intrant englobe dans l'agriculture la totalité des produits non naturels, que l'on ne trouve pas dans les sols, et qui sont ajoutés manuellement dans le but d'optimiser la qualité et le rendement de la culture.

Objectifs

Le projet ANR BAKERY vise à :

- Décrire la diversité socio-culturelle des pratiques de boulangerie et la diversité microbiologique des levains chez les boulangers et paysan-boulangers en France
- Etudier les effets des variétés de blé, du terroir et des pratiques boulangères sur la diversité du microbiome levain, la qualité sensorielle et nutritionnelle du pain ainsi que les préférences des consommateurs
- Analyser les interactions microbiennes au sein du levain et leurs conséquences sur le fonctionnement du levain et sur la qualité du pain
- Intégrer toutes les données pour identifier les déterminants de la diversité biologique et socio-culturelle dans la chaîne boulangerie
- Envisager des stratégies pour la conservation de la diversité biologique et de la diversité socio-culturelle en boulangerie.

Source :

https://www6.inra.fr/bakery/Page-d-accueil/Bakery

Vidéo de présentation : Biodiversité des levains pour des pains de qualité
www.inra.fr/Entreprises-Monde-agricole/Resultats-innovation-transfert/Tous-les-magazines/Projet-Bakery



Figure 54. Photo de groupe – Janvier 2018



Figure 55. Analyse sensorielle, épreuve de Napping – Novembre 2016



Figure 56. Analyses physico-chimiques au fournil – Novembre 2017

C. Ma thèse pour tous

Cette partie se veut compréhensible et accessible à tous ceux souhaitant connaître le travail de thèse. Pour plus de précisions sur la bibliographie, les résultats et les expériences, vous avez la possibilité de lire le reste de la thèse. Bonne lecture !

Tout le monde connaît le pain. Le pain a de multiples formes, est levé, non-levé, cuit dans le four familial ou dans le fournil du boulanger du village. Il est non seulement important pour la nutrition mais également dans notre vie économique, sociale et rituelle. Il a été et est toujours un aliment de base en Europe et au Moyen-Orient, et a traversé les siècles jusqu'à notre époque (De Tonnac, 2010). La fabrication du pain a suivi la domestication des céréales il y a plus de 10000 ans. La pâte à pain est composée de farine, d'eau, d'un agent de fermentation (levure et/ou levain) et de sel. Elle est fermentée après le pétrissage pendant le « pointage » et après avoir été façonnée lors de « l'apprêt ». La pâte est alors prête pour être cuite au four (Figure 31).

Bien que le pain soit un aliment d'importance historique, culturelle et nutritive en France, la diversité microbienne utilisée par la filière boulangerie française est mal connue. Les procédés de fabrication du pain ont été bien décrits chez les boulangers français mais l'ensemble des pratiques boulangères artisanales n'a jamais été répertoriée ni mise en lien avec la diversité biologique (blés, diversité des micro-organismes des levains) de la filière.

Depuis les années 1980, le pain au levain connaît un regain de popularité grâce aux consommateurs à la recherche de l'authenticité et du goût du pain (Calvel, 1981). Manger du *vrai* pain est devenu un moyen de se réapproprier son alimentation, de maîtriser et de savoir ce que l'on mange. Grâce à la réaction de la profession, le consommateur retrouve le goût pour les pains d'autrefois, profitant d'un pétrissage lent, de pains reposés longtemps et fabriqués à base de levain pour lequel la fermentation s'est faite naturellement. Le renouveau du pain au levain passe par des paysans et petits artisans meuniers, des restaurateurs gastronomes et des particuliers boulangers amateurs. Le pain au levain doit sa qualité organoleptique à son odeur, sa saveur et ses arômes (Gobbetti et al., 2014b). Outre son intérêt organoleptique, le levain améliore la valeur nutritionnelle du pain en facilitant l'utilisation de farines plus riches en fibres, en augmentant l'accessibilité aux minéraux et la conservation du pain (Katina et al., 2005). Au cours de cette thèse, nous avons travaillé avec des paysans-boulangers et de nombreux boulangers utilisant le levain : une pâte à base de farine et d'eau, avec une fermentation naturelle

de 24h (décret n°93-1074 sur le pain au levain). Ces boulangers cherchent par ce procédé à réduire leur empreinte écologique et à typer leurs produits.

Ma thèse s'inclut dans le projet BAKERY afin de répondre à plusieurs objectifs du projet. Plus précisément, nous avons mis en place des expériences participatives pour répondre aux questions scientifiques suivantes :

- Est-ce que la géographie, les pratiques boulangères, les variétés de blé, le terroir, le fournil impactent la diversité des communautés microbiennes des levains ?
- D'où viennent les micro-organismes des levains (graines, farine, eau, fournil) ?
- Quel est l'impact des communautés microbiennes, du terroir, des variétés de blé, des boulangers sur la qualité nutritionnelle et organoleptique des pains ?

I. Un peu de bibliographie

1.1. Brève histoire du pain dans le monde et en France

Les archéologues retracent la fabrication du pain dès le Mésolithique. Ils ont retrouvé des traces de pain non levé il y a 14400 ans en Jordanie (Arranz-Otaegui et al., 2018) et des traces de pâtes, de pain et de porridge observés au microscope sur un site archéologique d'Anatolie centrale (Çatalhöyük East, actuelle Turquie) qui date de 6000-7100 ans avant JC (Carretero et al., 2017). Les Egyptiens (de ~3000 à – 30 ans avant JC) étaient surnommés quant à eux « les mangeurs de pains », car c'était leur nourriture par excellence. Lors de l'excavation de la tombe de Toutankhamon, du pain et une meule manuelle pour moudre le grain ont été trouvés (Carter and Mace, 2012; Leek, 1972). Les Grecs ont contribué à l'amélioration de la meunerie par l'invention de moulins à pierre sophistiqués, comme décrit à Olynthus (Frankel, 2003). Des fouilles archéologiques dans les Pyrénées ont permis la mise à jour de l'activité humaine du IIe au XIIe siècle. Les chercheurs décrivent l'activité agriculture et mentionnent que ce peuple écrasait son grain pour faire du pain (Alonso et al., 2010). D'après différents écrits historiques, le pain était objet de reconnaissance sociale et d'instrument politique au Moyen-Âge. Il portait le nom de la caste qui devait le consommer : « pain de cour », « pain de chevaliers », « pain d'écuyers », etc. Le grain à écraser et la pâte levée étaient amenés aux moulins et aux fours des seigneurs. A partir du XVIe siècle, une police du grain et du blé détermine le prix de vente du pain. A la fin du XVIIIe siècle, avec la suppression de la gabelle (impôt sur le sel), l'usage du

sel dans le pain se répand. La découverte des micro-organismes et l'industrialisation de la société ont marqué un tournant dans le monde de la boulangerie. Le pétrin mécanique apparait au début du XIXe siècle et la levure pressée à la fin de ce même siècle. La hausse du niveau de vie transforme le pain d'une nourriture de base en aliment d'accompagnement. La technique de pétrissage « intensifiée » apparait et permet la fabrication d'un pain très blanc, plutôt fade et se conservant peu de temps. Il change du pain noir rationné pendant les deux guerres mondiales. Cette baisse générale de la qualité du pain enclenche la diminution de sa consommation et le développement des boulangeries industrielles.

1.2. Le pain en France

La place du pain est très importante en France. C'est un aliment doté d'une puissance symbolique, incarnant la notion de partage. Nous avons tous des souvenirs de rituels entourant la consommation du pain : « On ne le posait pas à l'envers sur la table, et avant d'entamer le pain, il fallait faire une croix avec le couteau derrière le pain », « c'est un aliment que l'on respecte », « c'est un aliment qui ne se jette pas » (Masson et Bubbendorf, 2016). L'importance du pain en tant que symbole et valeur est également démontrée par les expressions « gagne-pain », « pour une bouchée de pain », « avoir du pain sur la planche », couramment utilisées dans notre vocabulaire (Roussel et al., 2002).

Le pain de tradition française est réglementé par le décret N°93-1074 de 1993 qui définit précisément ce que doit être un pain dénommé « pain de tradition française », ou "pain traditionnel français", ou "pain traditionnel de France". Selon l'article 2, ce pain doit être composé d'un mélange de farine de blé, d'eau potable et de sel de cuisine, être fermenté à la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et/ou au levain et éventuellement contenir de la farine de fèves, soja ou malt de blé en proportion faible (respectivement 2%, 0,5%, 0,3% de farine). Selon l'article 4 de ce décret, « le levain est une pâte composée de farine de blé et de seigle, ou de l'un seulement de ces deux ingrédients, d'eau potable, éventuellement additionnée de sel, et soumise à une fermentation naturelle acidifiante, dont la fonction est d'assurer la levée de la pâte. Le levain renferme une microflore acidifiante constituée essentiellement de bactéries lactiques et de levures. Toutefois, l'addition de levure de panification (*Saccharomyces cerevisiae*) est admise dans la pâte destinée à la dernière phase du pétrissage, à la dose maximale de 0,2% par rapport au poids de farine mise en œuvre à ce stade. ». L'article 3 de ce même décret dit que « peuvent seuls être mis en vente ou vendus sous une dénomination comportant la mention complémentaire "au levain" les pains (…) présentant un potentiel hydrogène (pH) maximal de

4,3 et une teneur en acide acétique endogène de la mie d'au moins 900 parties par million ». Nos résultats et de précédentes recherches montrent que cette définition est trop restrictive et ne prend pas en compte la diversité des pratiques boulangères et des propriétés des pains au levain (Lhomme et al., 2015a; Michel et al., 2016; Roussel et al., 2002). Un travail est en cours pour une nouvelle définition du levain, du pain au levain au plus proche de la réalité.

1.3. Les différentes pratiques boulangères

La France est représentée par une multitude de pratiques boulangères. Parmi les boulangers, on distingue les artisans boulangers inscrits à la chambre des métiers, les paysans boulangers qui sont inscrits ou non à la chambre des métiers et des boulangeries industrielles. Ils sont amenés à réaliser du pain au levain naturel à fermentation lente et/ou à la levure. Ces boulangers diffèrent principalement dans leur façon de procéder pendant la panification et dans la fréquence des panifications. Actuellement, le nombre de boulangeries artisanales décroit avec l'offre pléthorique des hypermarchés et nouvelles chaînes de boulangerie. Il semble nécessaire de proposer une diversité de pratiques et de goûts pour répondre aux besoins de la diversité des consommateurs.

Sur 33000 artisans (source Hubert Chiron), il est difficile d'avoir une estimation exacte du nombre de paysans-boulangers. Leur nombre est en forte croissance. Ces boulangers restent cependant très peu mécanisés et ont une production hebdomadaire et mensuelle modeste. Ils vendent notamment du pain à la ferme, en AMAP (Aide pour le Maintien de l'Agriculture Paysanne), dans les circuits locaux courts. Ils proposent une alternative à la boulangerie industrielle. Ils sont au premier plan pour réhabiliter les blés anciens, afin de concourir au maintien de la diversité des blés et avoir des blés adaptés à leur terroir. Il s'agit donc d'une démarche qui replace le paysan dans son rôle de conservateur de semences, qui l'inscrit dans une économie de proximité et lui redonne son autonomie.

2. Quelques notions sur les blé et les farines

L'amidon est le constituant majoritaire du grain de blé (70%) et il sert de réserve pour la plantule en début de germination (Joubert, 2017). Il est constitué de molécules de glucose sous forme de deux polymères différents : l'amylose et l'amylopectine. Les protéines de la farine sont composées de 80 à 85% de protéines de réserves, les gliadines et les gluténines (Feillet, 2000). Ce sont ces deux protéines qui vont constituer le gluten lors du pétrissage. Les gliadines représentent 30 à 40% des protéines totales du blé et sont responsables de la viscosité

de la pâte. Les gluténines (40 à 50%) sont retrouvées dans l'albumen du grain et confèrent à la pâte à pain ses propriétés d'élasticité, sa cohésion, sa ténacité et sa résistance aux déformations. Un ratio gluténine/gliadine permet de déterminer rapidement les caractéristiques d'une pâte et détermine la force boulangère.

La meunerie permet de passer du blé à la farine par trois grandes étapes : le nettoyage, le mouillage et la mouture (Roussel et al., 2002). Le nettoyage permet d'éliminer les impuretés (poussières, cailloux, paille…). Le mouillage est l'étape qui consiste à ajouter de l'eau pour faciliter la séparation entre l'enveloppe et le grain de blé. La mouture permet de séparer les 3 constituants du grain de blé que sont l'amande farineuse, l'enveloppe et le germe, et de réduire les particules d'amande en farine.

3. Les levains de panification

3.1. Définition du levain et classification

Le levain est une pâte fermentée issue d'une fermentation naturelle de farine et d'eau, avec la présence de bactéries et de levures (De Vuyst et al., 2014b, 2017; Gobetti et al., 1994; Huys et al., 2013; Siepmann et al., 2017). Il est utilisé pour faire lever le pain, mais permet aussi une augmentation de la durée de conservation du pain, de la qualité nutritionnelle et lui confère une flaveur spécifique (Banu et al., 2011; Gobbetti and Gänzle, 2012b; Hansen and Schieberle, 2005; Huys et al., 2013). La flaveur du pain regroupe les sensations olfactives, gustatives et tactiles du pain. La Figure 57 présente une coupe d'un levain en microscopie électronique.

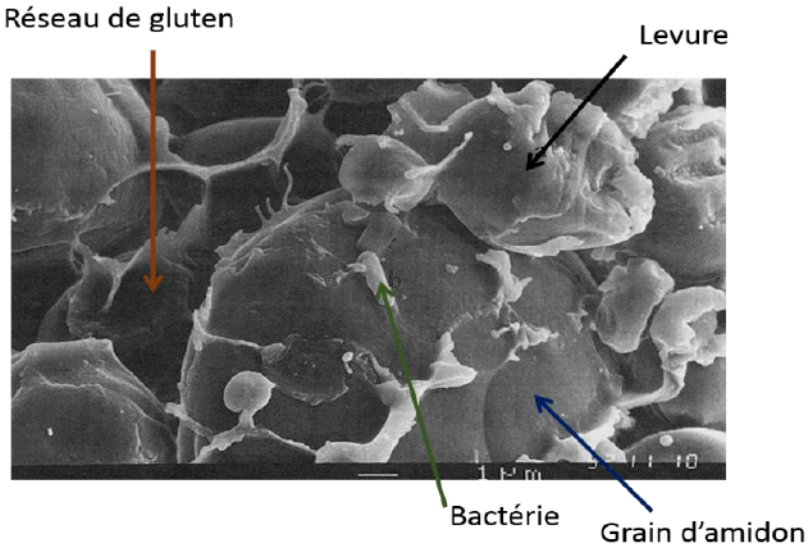


Figure 57. Coupe d'un levain en microscopie électronique d'après Onno et al., 2009

Les levains peuvent être classifiés en trois groupes (Corsetti, 2013; De Vuyst and Neysens, 2005; Onno, 1994; Stolz and Böcker, 1996).

- Les levains de type I, ou levains traditionnels, avec une fermentation spontanée par une flore microbienne présente naturellement. La sélection des micro-organismes se fait au cours des rafraîchis, quand l'artisan mélange de l'eau et de la farine au levain.
- Les levains de type II ou levains rapides, qui sont produits par un processus connu et par des méthodes industrielles sous forme liquide. Ils sont utilisés surtout pour l'acidification de la pâte rapide et une inhibition de la croissance des levures naturellement présentes (Corsetti, 2013; Gobbetti, 1998). La levée de la pâte est assurée par l'ajout de levure de boulangerie « starter ».
- Les levains de type III ou levain déshydraté-congelé, sous forme de poudre, contiennent principalement des bactéries lactiques. La levée de la pâte est assurée par l'ajout de levure starter.

3.2. Les levains de panification sont composés de bactéries lactiques et de levures

Les bactéries lactiques des levains incluent les genres *Enterococcus*, *Weissella, Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*, et plus de 60 espèces ont été décrites (De Vuyst et al., 2014b, 2017; Huys et al., 2013; Siepmann et al., 2017). Elles peuvent avoir deux types de métabolisme. Elles sont soit homofermentaires, ne produisant que de l'acide lactique ; ou hétérofermentaires, c'est-à-dire qu'elles produisent de l'acide lactique, mais aussi de l'acide acétique et du CO_2. Elles sont également capables de produire des composés volatils pouvant impacter la flaveur du pain (Gobbetti, 1998). Leur métabolisme joue alors un rôle dans la flaveur du pain, la texture, les qualités nutritionnelles et la préservation du pain. La bactérie *L. sanfranciscensis* a été découverte dans un levain de San Francisco (USA) et est décrite comme l'espèce dominante des levains de panification (Gobbetti et al., 1996).

Les levures des levains appartiennent au genre *Candida*, *Hyphopichia*, *Kazachstania*, *Kluveryomyces*, *Lachancea*, *Lodderomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Torulaspora* et *Wickerhamomyces* (Carbonetto et al., 2018). Plus de 30 espèces de levures ont été décrites dans les levains de panification. Les levures ont un métabolisme aérobie (en présence d'oxygène) et pour certaines d'entre elles anaérobie (sans oxygène). Elles transforment le glucose en gaz carbonique et en éthanol. Une partie du CO_2 va

être retenu par la pâte en fonction de la capacité de rétention gazeuse du réseau de gluten, permettant au pain de lever. Elles produisent aussi d'autres métabolites comme le glycérol, l'acétate, de nombreux composés volatils aromatiques, des exopolysaccharides qui impactent les propriétés viscoélastiques de la pâte et la texture et l'alvéolage du pain. Les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Kazachstania humilis* sont fréquemment retrouvées dans les levains.

3.3. Les interactions entre les levures et bactéries

Dans le levain, et notamment dans les levains de type I qui sont maintenus par rafraîchis (ajout régulier de farine et d'eau), on suppose l'existence de relations de facilitation (positives-positives) entre certaines espèces de bactéries lactiques et de levures. En effet, l'alimentation croisée inclut l'utilisation de métabolites ou de déchets d'une espèce comme nutriment pour une seconde espèce (Seth and Taga, 2014). Par exemple, les bactéries lactiques hydrolyseraient le maltose en glucose pour des souches du genre *Kazachstania* incapables d'utiliser le maltose comme substrat (De Vuyst and Neysens, 2005; Gobbetti, 1998; Venturi et al., 2012b). D'autre part, avec des relations négatives-négatives, pendant la fermentation, bactéries lactiques et levures produisent et relarguent d'autres composés qui ne sont pas des nutriments, pouvant modifier les propriétés physico-chimiques de l'environnement à l'avantage ou désavantage de certaines espèces. L'acide acétique et l'acide lactique produits par les bactéries lactiques et levures peuvent exclure ou inhiber la croissance des bactéries non « lactiques » et des contaminants fongiques (champignons) en abaissant le pH de l'environnement. Les levures produisent aussi des composés antimicrobiens ressemblant à des bactériocines. Quelques souches de *Saccharomyces cerevisiae* sont connues pour produire des composés avec des activités antibactériennes (Al-Jassaci et al., 2016; Osborne and Edwards, 2007). Ces interactions et activités ainsi que de nombreux autres paramètres physico-chimiques favorisent la stabilité du microbiote (bactéries et levures).

3.4. D'où pourraient venir les bactéries et levures des levains ?

Notre première hypothèse est celle du terroir et du microbiote du sol. Le microbiote du terroir est probablement composé du microbiote du sol, des blés, de l'air, du matériel agricole, des insectes. Le type d'agriculture et les pratiques agricoles pourraient être des facteurs affectant le microbiote du levain, issu d'une agriculture biologique ou non (Lhomme et al.,

2014, 2015a). L'abondance des levures serait plus importante dans les sols agricoles fertilisés (Vadkertiová et al., 2017).

Les bactéries et levures viendraient-elles de la flore des graines ? De la flore de la farine ? Des bactéries lactiques ont été retrouvées dans et sur les grains d'une plante (Pontonio et al., 2018) La graine pourrait alors représenter un réservoir potentiel pour les bactéries (Minervini et al., 2018a). La transmission pourrait alors se faire par la farine après l'écrasement du grain (De Vuyst et al., 2009) (Minervini et al., 2015b).

Et si la flore venait de la boulangerie ? L'hypothèse selon laquelle le microbiote de l'environnement du boulanger et de son fournil, le « microbiote du foyer », joue un rôle important dans l'installation de la flore a été montrée en Italie. Cela a été décrit pour le fromage ou le vin (Gobbetti et al., 2018; Irlinger et al., 2015; Quijada et al., 2018). Le microbiote du levain mature pourrait aussi provenir d'ingrédients supplémentaires que l'artisan choisirait de mettre : houblon, miel, fruits trop mûrs, grains de raisin, moût de raisin, sel, sucre… (Minervini et al., 2014). L'eau n'est actuellement pas considérée comme réservoir de bactéries pouvant contaminer le levain (Gobbetti et al., 2016). Cependant, de futures études devraient être menées afin de s'assurer de cette hypothèse, également de l'impact de l'eau sur la texture de la pâte et la durée de vie du pain, et d'un impact sur l'activité des micro-organismes.

Les bactéries et levures proviendraient-elles des insectes, des oiseaux ou du boulanger ? La bactérie dominante des levains *Lactobacillus sanfranciscensis* a été retrouvée prédominante dans les échantillons fécaux de deux insectes. Les déjections relâchées par les insectes dans les produits céréaliers stockés pourraient être le réservoir naturel de *L. sanfranciscensis* (Boiocchi et al., 2017b). Les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Torulaspora delbrueckii* ont été retrouvées dans le microbiote de la drosophile et dans les levains (Stefanini, 2018). Des levures ont été retrouvées dans le bec des Nandous d'Amérique, une espèce d'oiseaux d'Amérique du Sud (Brilhante et al., 2013) et des cloaques des oiseaux migrateurs en Sicile (Francesca et al., 2012).

II. Description de la diversité des bactéries et des levures en France

1. Collecte et analyse des levains des boulangers de BAKERY

Avec le projet BAKERY, nous avons pu échantillonner 40 levains de panifications d'artisans boulangers et de paysans-boulangers dont 35 produisant du levain biologique et 5 non biologique. Les boulangers nous ont transmis un levain tout-point, c'est-à-dire fermenté et

pouvant être utilisé pour une panification. La carte de France ci-dessous présente la situation géographique des boulangers (Figure 58).



Figure 58. La carte de France : chaque point représente un boulanger de l'étude.

Les levains ont été étudiés au laboratoire par « microbiologie classique » où nous avons identifié les espèces à partir de boîtes de Petri et par des méthodes de biologie moléculaire où nous avons extrait l'ADN total du levain puis analysé l'ADN avec du séquençage à haut-débit. Cette méthode présentée sur la figure ci-dessous (Figure 59).

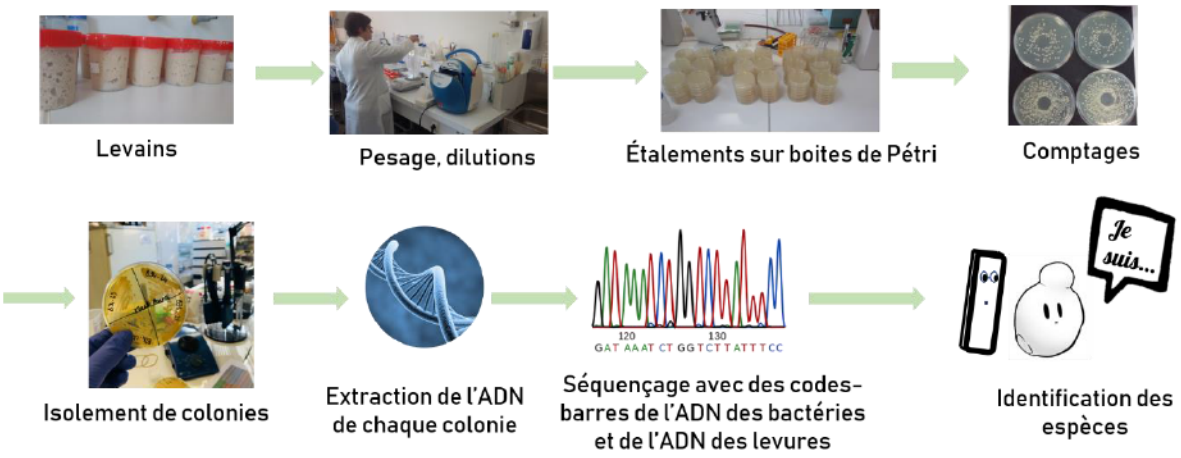


Figure 59. Protocole d'identification des espèces de bactéries et de levures à partir de boîtes de Petri

2. Les résultats en 3 points

2.1. La diversité des bactéries lactiques en France est grande !

De nombreuses espèces ont été retrouvées seulement chez les paysans-boulangers ou chez les artisans-boulangers (Figure 60). Dans notre étude, 19 espèces ont été identifiées. Nous avons retrouvé de 1 à 5 espèces par levain. Il existe une prédominance de l'espèce *Lactobacillus sanfranciscensis* (en orange sur la figure ci-dessous). Chez les artisans-boulangers, 17 espèces ont été décrites, dont 14 espèces spécifiques venant de pratiques différentes ! Chez les Paysans-boulangers : 5 espèces dont 2 espèces spécifiques (*Lactobacillus brevis*/*L. paralimentarius*). Il ne semble pas avoir de structuration géographique expliquant la diversité des espèces.

2.2. La diversité des levures dans les levains est grande et est structurée par la diversité des pratiques

Nous avons identifié 12 espèces dominantes, de 1 à 4 espèces par levain. Les 3 espèces les plus rencontrées sont *Kazachstania humilis* (en bleu mer), *Kazachstania bulderi* (en jaune ocre) et *Saccharomyces cerevisiae* (en rouge). Deux espèces ont été nouvellement décrites : *Kazachstania saulgeensis* (Jacques et al., 2016) et *Kazachstania sp.* Il ne semble pas avoir de structuration géographique, mais cependant une différence de flore en fonction des pratiques boulangères (Figure 60).

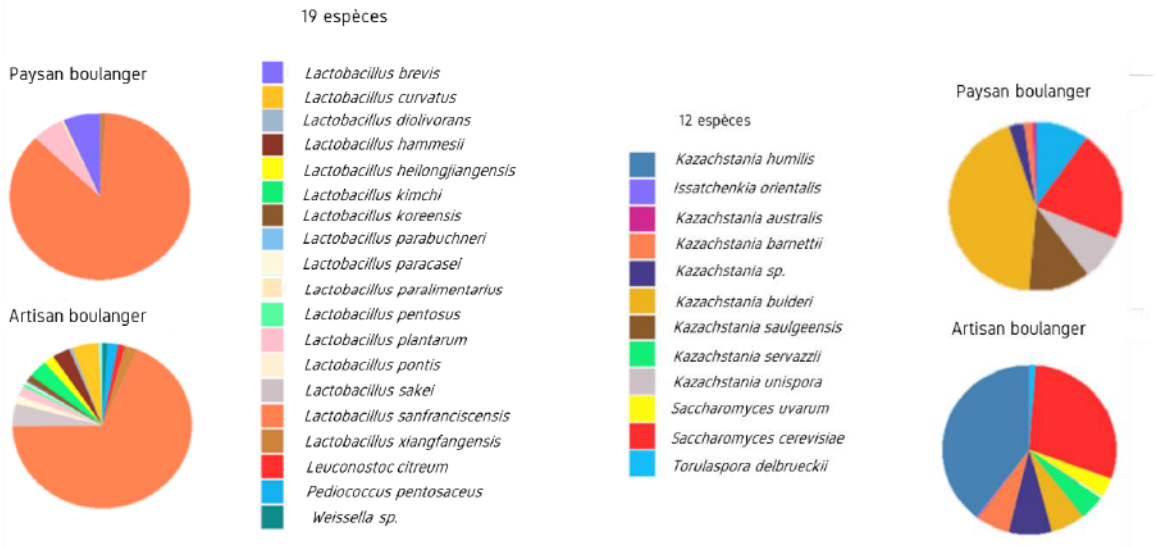


Figure 60. Espèces retrouvées dans les levains français. A gauche les bactéries, et à droite les levures

2.3. Les caractéristiques physico-chimiques des levains et des pains

Nous avons également étudié les caractéristiques physico-chimiques. Nous avons mesuré le pH, l'acidité titrable totale, dosé l'acide lactique et acétique et calculé le quotient fermentaire (ratio entre l'acide lactique et acide acétique). Les résultats sont présentés dans la figure Figure 61 ci-dessous. Le pH des levains est compris entre 3.54 et 4.03, avec une moyenne de 3.80. L'acide titrable totale est comprise entre 13 et 27.2 mL de soude 1N (moyenne 17.44). Le quotient fermentaire est variable, compris entre 1.99 et 10.3 avec une moyenne de 5.32 et donne une idée du ratio entre l'acide lactique et l'acide acétique. Concernant les pains des boulangers (Figure 62), ils ont un pH moyen de 4.48 (au-dessus de la réglementation française). On observe donc une grande diversité des caractéristiques des levains, diversité liée aux pratiques (durée et température de fermentation, type de farine, etc.) et sans doute aussi à la flore constitutive des levains.

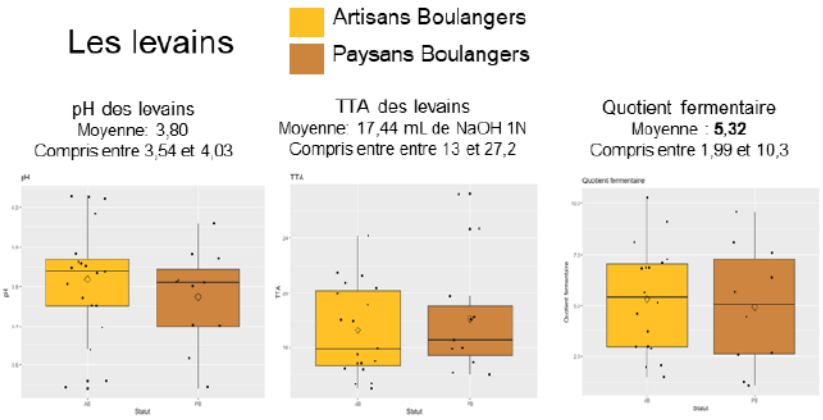


Figure 61. Acidité des levains de BAKERY

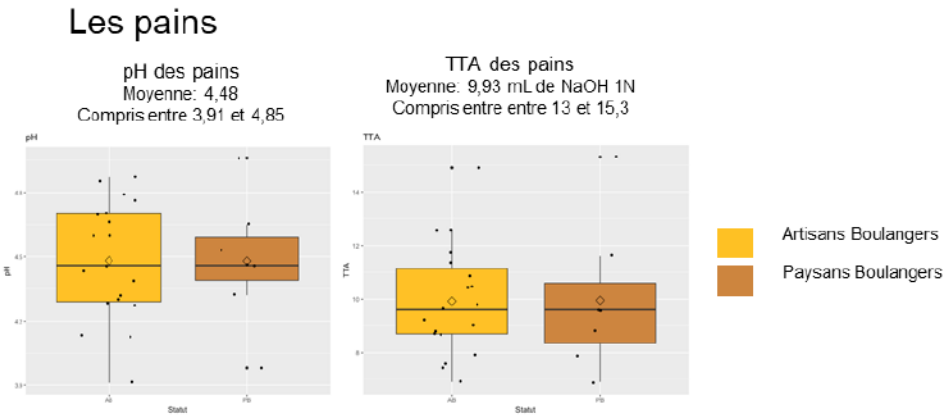


Figure 62. Acidité des pains de BAKERY

Après avoir décrit la diversité des bactéries et levures dans les levains, nous nous sommes penchés sur l'origine de la microflore des levains. Nous avons mis en place une expérience participative où des agriculteurs, boulangers et scientifiques se sont investis pour répondre à cette question.

III. Etude de l'effet terroir, des variétés de blé, des pratiques boulangères sur la diversité microbienne dans les levains et sur les qualités nutritionnelles et organoleptiques du pain

1. Les participants

Le dispositif expérimental a été concu, mis en place par différents acteurs multidisciplinaires (Figure 63) :

- Les agriculteurs Gilles Simonneaux, Laurent Marteau, Florent Mercier et le Lycée Agricole du Rheu
- Des boulangers, Hélène Simon, Lili Moyses, Michel Perrin et Pain Virgule
- Des équipes scientifiques spécialisées en agronomie (SAD-Paysage), en génétique et biomathématique (GQE – Le Moulon), en collection de levures (CIRM Levures, en collection de bactéries (CIRM bactéries), des microbiologistes (ONIRIS, SPO), en analyses sensorielles (ITAB), en psychosociologie (UBO)
- Le Réseau Semences Paysannes
- Les boulangers de BAKERY lors de colloques, séminaires, rencontres

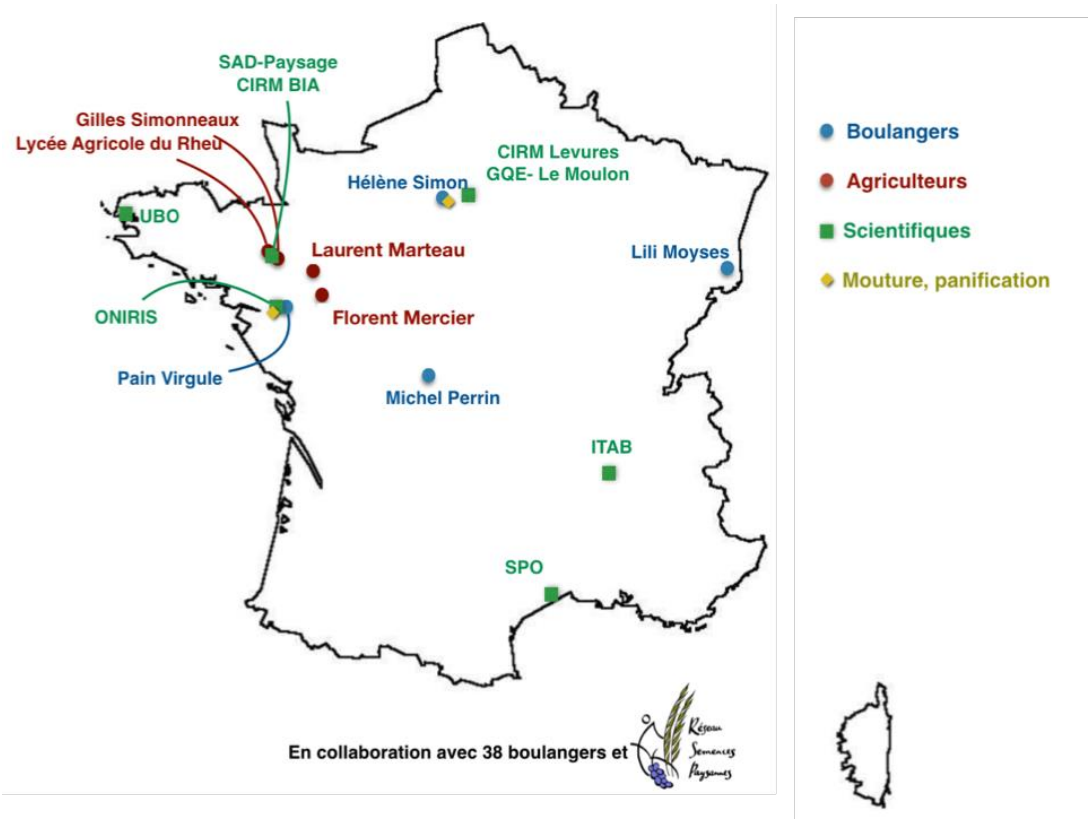


Figure 63. Carte des participants expérience effet terroir, variétés, boulangers

2. Le dispositif expérimental

Un dispositif expérimental a été mis en place en lien avec un projet interrégional breton et des Pays de la Loire (SAFARI) par l'équipe de Véronique Chable (INRA Rennes- SAD Paysage). Trois populations de blés anciens (Bladette de Provence, Redon Roux Pâle, Saint Priest le Vernois Rouge) et trois variétés de blés commerciales (Renan, Chevalier, Pirénéo) ont été cultivées sur quatre terroirs différents, avec des semis en conditions de production au semoir de 3 m et des modalités randomisées entre les fermes. Les terroirs appartiennent aux agriculteurs Florent Mercier (variétés populations), Gilles Simonneaux (variétés populations et commerciales), le Lycée agricole du Rheu (variétés populations et commerciales) et Laurent Marteau (variétés commerciales). Pour des questions de quantité de grains, nous avons mélangé les variétés modernes d'une part et les populations anciennes d'autre part pour faire deux lots « modernes » et « anciens ». Ce dispositif nous a permis d'obtenir 6 lots de grains (un mélange de variétés populations x 3 terroirs et un mélange de variétés commerciales x 3 terroirs). Les farines T80 des six lots de graines obtenues sur moulin Astrié ont été envoyées à quatre boulangers : Michel Perrin, Pain Virgule, Hélène Simon, Lili Moyses, qui ont initié et maintenu six levains pendant trois semaines. Le protocole était propre à chaque boulanger, mais identique pour les 6 farines. Ce protocole a été noté sur une feuille de suivi des levains (Table 37).

	Poids farine	Température farine	Volume eau	Température eau	Température de la zone de stockage des levains	Hauteur de la pousse	Remarques (odeurs, couleurs…)
Levain 1							
Levain 2							
Levain 3							
Levain 4							
Levain 5							
Levain 6							

Table 37. Exemple d'un tableau de la feuille de suivi des levains

Des échantillons de levains ont été prélevés à intervalles réguliers pour les analyses microbiologiques et physicochimiques. En parallèle, des levains ont été produits au laboratoire avec le même protocole. Les levains ont été rapatriés à l'INRA de Nantes pour une panification avec un diagramme fixe avec l'aide de Philippe Roussel (Triptolème). Des photos (Figure 64) présentent l'expérience collaborative et participative.



Figure 64. Retour en quelques images de nos 4 boulangers ayant initié et maintenu au cours du mois d'avril 2016, de leur fournil et des levains.

3. Les analyses à ONIRIS, à l'INRA et à l'ITAB

Nous avons caractérisé la flore microbienne des graines, farines, levains par des séquençages à haut-débit, et la flore microbienne des levains S3 (levains finaux) avec un étalement sur boite de Petri (Figure 65).

Les farines ont été analysées : taux de gluten humide, activité enzymatique, concentration en amidon endommagé, détermination du gluten index.

Nous avons également analysé les pains : Acidité, hauteurs, largeurs des tranches de pains, masse volumique, taux en acides organiques et sucres, composés volatiles aromatiques, taux en minéraux, évolution du gluten au cours de la panification, analyses sensorielles (Figure 66).

Toutes les données ont été traitées statistiquement avec un modèle mathématique pour voir s'il y avait un effet des facteurs terroir, variété de blé et pratiques boulangères.

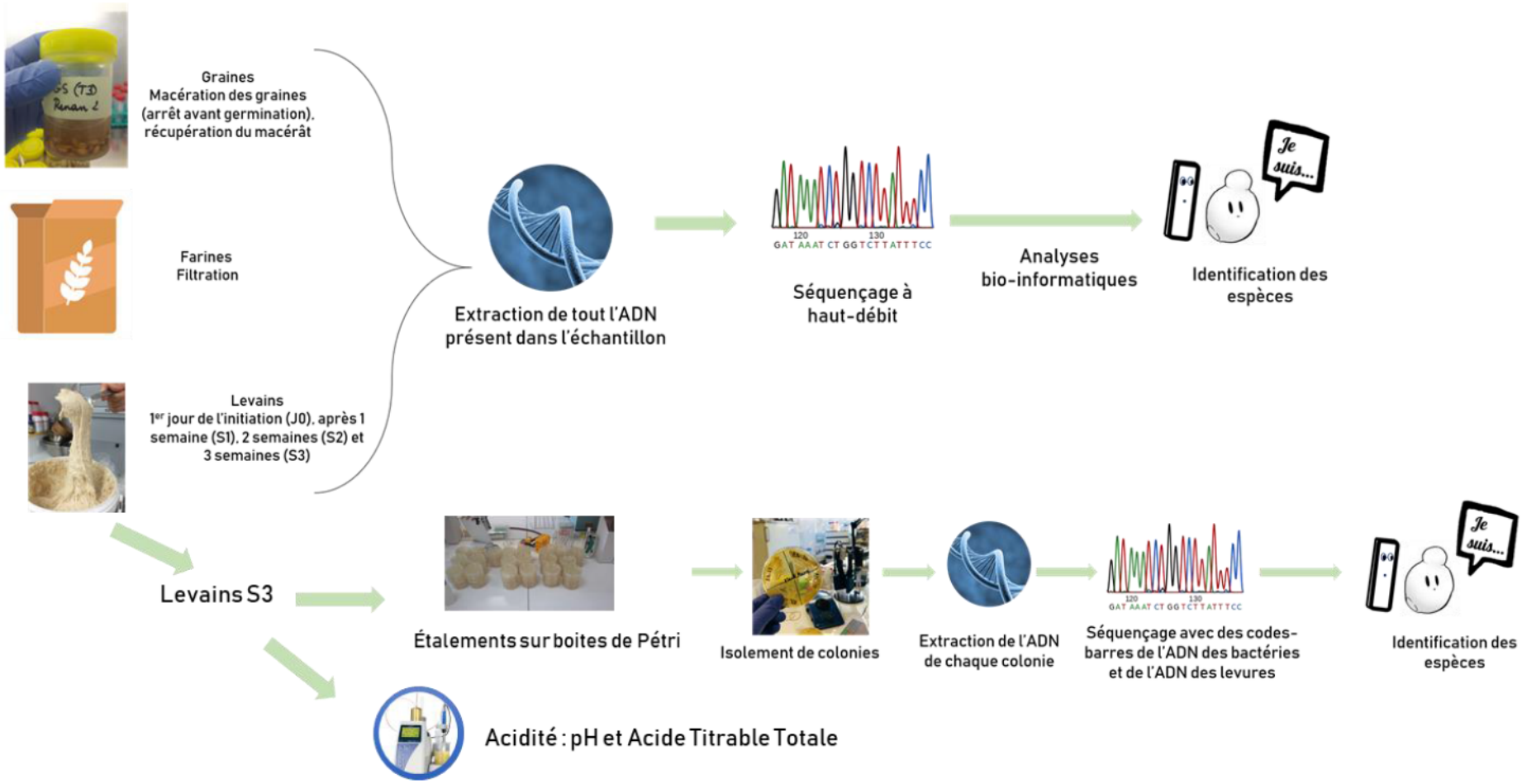


Figure 65. Schéma de la caractérisation de la flore microbienne

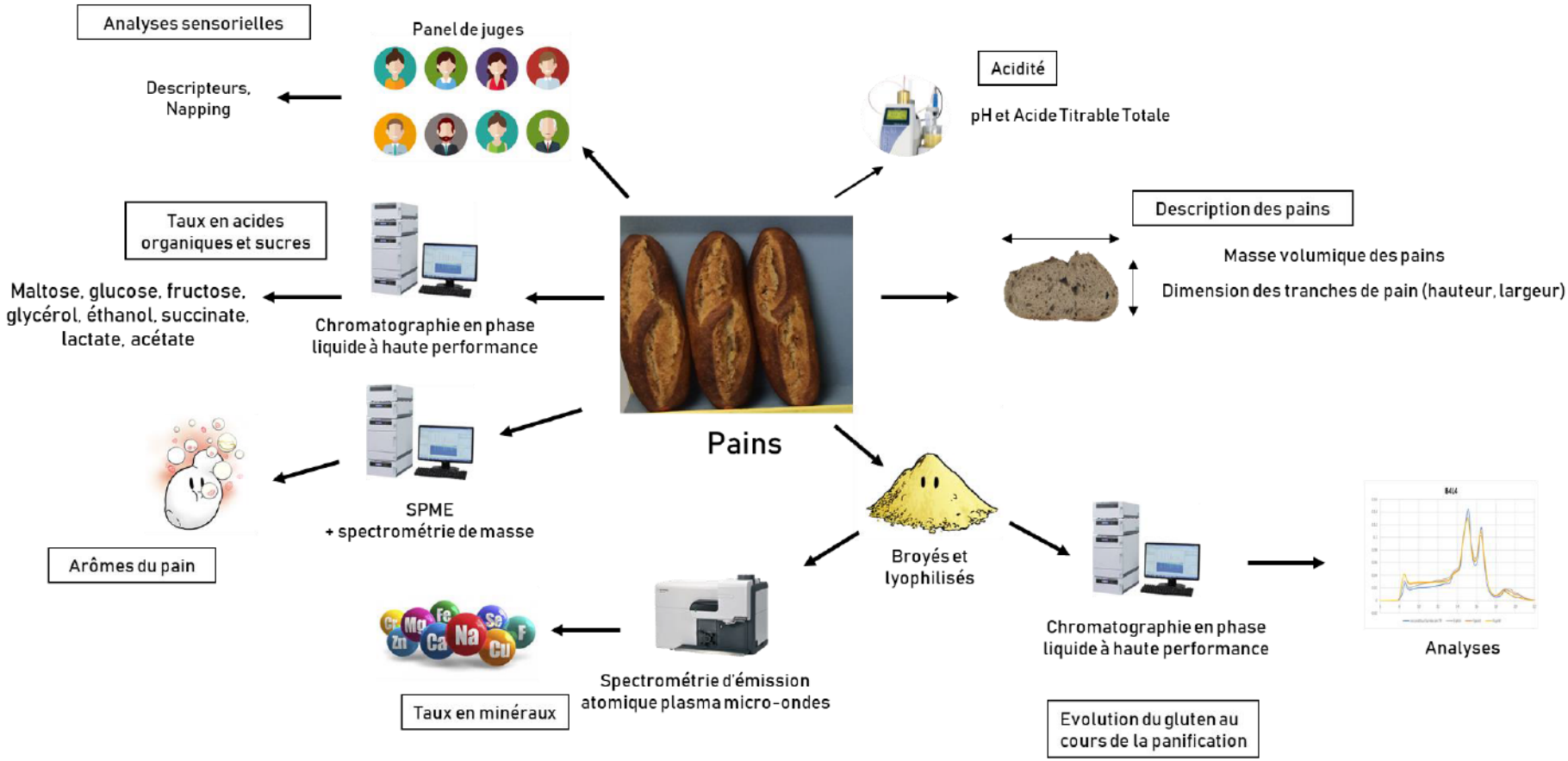


Figure 66. Représentation schématique de l'analyse des pains

4. Nos résultats en 15 points

1) Les propriétés de la farine

- Il y a un effet fort de la variété du blé (modernes/populations) sur les propriétés de la farine quel que soit le terroir où les variétés de blé ont été plantées, en terme d'absorption d'eau, du diamètre moyen du grain, du taux de cendres, et d'autres données technologiques.

- D'après les analyses sur le gluten humide, il y a plus de protéines de gluten sur les mélanges anciens que sur les mélanges modernes. Explication : les blés ont été sélectionnés pour le rendement (avoir du blé panifiable en quantité). Cela a induit une baisse de la teneur en protéines dans les variétés modernes, ce qui fait augmenter le poids des grains et l'amidon.

- On retrouve plus de gluténines dans les variétés modernes et de gliadines dans les variétés anciennes. Ce dernier résultat est corroboré par l'indice du Gluten index (passage de la farine à travers un tamis, index faible= taux de passage important, quand proche de 100=difficulté de passage). Avec les blés anciens, le gluten est moins résistant = gluten plus mous = plus de gliadines. Ceci permet une activité accrue des enzymes amylases avec libération de glucides simples fermentescibles.

2) Le pH des pains fabriqués à partir de différents levains est compris entre 3.86 et 4.15 et dépendant des pratiques des boulangers, alors que l'acidité titrable totale dépend aussi des variétés de blés. Le pH est influencé notamment par la production d'acide lactique par les bactéries. On a retrouvé plus d'acides dans les variétés anciennes, probablement liée à l'effet spécifique de la mouture.

3) Dans les levains utilisés pour la panification, la densité des levures et des bactéries dépend des pratiques du boulanger.

4) La flore microbienne du levain est plus ou moins active selon le type de variété de blé. Nous avons retrouvé plus d'amidons endommagés dans les variétés de blé modernes, donc il y a plus de sucres simples disponibles pour la fermentation par les levures.

5) La flore microbienne semble être stabilisée en terme de diversité d'espèces présentes à partir de 10 rafraîchis.

6) La pousse de la pâte est liée au levain plus forte avec variété moderne dans le cadre du protocole de panification utilisé et dépend de la capacité de la pâte (réseau du gluten) à retenir le CO_2 produit

7) Les pâtes faites à partir des variétés modernes de blé semblent permettre la production de plus de CO_2 au cours de la panification que celles des variétés anciennes. Il y a plus d'amidons endommagés au cours de la mouture dans les variétés modernes : les micro-organismes ont probablement plus de substrats glucidiques simples (« sucres ») à transformer en CO_2

8) La masse volumique des pains varie selon les levains et *in fine* à la capacité de la flore microbienne induite par les pratiques boulangères à produire du CO_2. Le résultat était déjà visible à la fin de l'apprêt, juste avant l'enfournement (Figure 67).

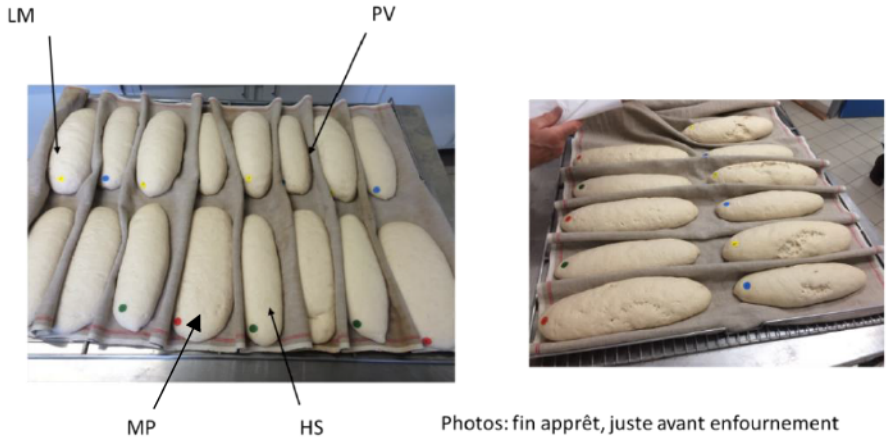


Figure 67. Photos des pains en fin d'apprêt, juste avant enfournement

Les initiales sont celles des boulangers et boulangeries : Lili Moyses (LM – pastilles jaunes), Pain Virgule (PV – pastilles bleues), Michel Perrin (MP- pastilles rouges) et Hélène Simon (HS – pastilles vertes)

9) Selon les espèces de levures, on obtient différentes fermentations et différents arômes. Pourquoi ? Les levures consomment les différentes ressources des farines et les transforment en gaz carbonique, en acides organiques et en arômes. Les levures étant différentes dans les différents levains, leur métabolisme et les produits de celui-ci sont différents.

10) La qualité sensorielle globale résulte à la fois des variétés, du terroir et des pratiques boulangères. Pourquoi ? Par exemple, des analyses des glucides simples des pains ont montré que les pains obtenus avec des variétés anciennes ont plus de ribose que des pains obtenus avec des variétés modernes. Les pentoses, comme par exemple les riboses sont des précurseurs d'arômes du caramel, pouvant expliquer le goût plus caramel, aromatique des pains aux variétés

anciennes. Les pentoses ne sont pas transformés en arôme caramel avec la même efficacité par les différents micro-organismes. C'est pour cela que cela dépend aussi de la flore des levains.

De plus, les arômes des pains (composés volatils aromatiques) semblent être liés au terroir et à la flore microbienne des levains. Les résultats du jury d'analyse sensorielle et les tests statistiques sur le contenu en sucres et alcool montrent : *i)* Les pains avec un goût beurré, brioché, céréaliers, caramel contiendraient plus de glucose, fructose, maltose. *ii)* Les pains typés comme acides, fruités, aromatiques contiendraient plus d'éthanol et de glycérol. *iii)* Les pains avec un goût malté, torréfié et longs en bouche contiendraient plus d'acétate, de succinate, de cuivre, de zinc, de fer. *iv)* Il existe un effet du boulanger et des variétés de blés sur la perception du jury.

11) Il existe un flux de micro-organismes le long de la filière. On retrouve des espèces de champignons et de bactéries de la graine jusqu'au pain. Cependant, chaque boulanger conduit à une flore microbienne propre. Les levains expérimentaux ont acquis une flore microbienne dominante identique à celle du propre levain du boulanger expérimentateur. Les levures qui dominent les levains n'ont pas été trouvées sur les grains ou dans la farine. Les espèces de bactéries lactiques ont été trouvées seulement dans le levain, sauf *L. sanfranciscensis* qui a été détecté dans les farines, mais pas l'extérieur du grain. Cette espèce trouvée dominante dans plusieurs levains en France suggère une dispersion par la farine. Est-ce que ce sont des bactéries endogènes du blé ?

12) La dynamique des bactéries et des levures est différente au fur et à mesure des rafraîchis. Les bactéries lactiques sont présentes dès le mélange farine et eau lors de l'initiation du levain puis augmentent en concentration au cours des rafraîchis. La levure dominante arrive dans la première ou deuxième semaine de rafraîchis dans les levains. Dans la Figure 68 ci-dessous, nous voyons une dominance d'espèces bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas* (en rouge) et *Pantoea* (en rose) dans les grains. Ces deux genres sont retrouvés dans la farine, avec des espèces du genre *Erwinia*, *Kosakonia*, etc. La flore des levains du jour de l'initiation (J0) se diversifie, avec l'apparition des espèces du genre *Lactobacillus* (en bleu foncé). *Lactobacillus* devient dominante au cours des rafraîchis, depuis l'initiation (J0) → après 1 semaine (S1) → 2 semaine (S2) → après 3 semaines (S3). Pour les champignons, plusieurs genres sont retrouvés dans les graines et les farines, *Alternaria*, *Penicillium*, *Vishniacozyma*… Les genres *Aureobasidium* et *Fusarium* augmentent en abondance relative dans les farines. A partir des levains S1, nous voyons apparaître des levures du genre *Kazachstania* (vert canard) et du genre *Saccharomyces* (rouge).

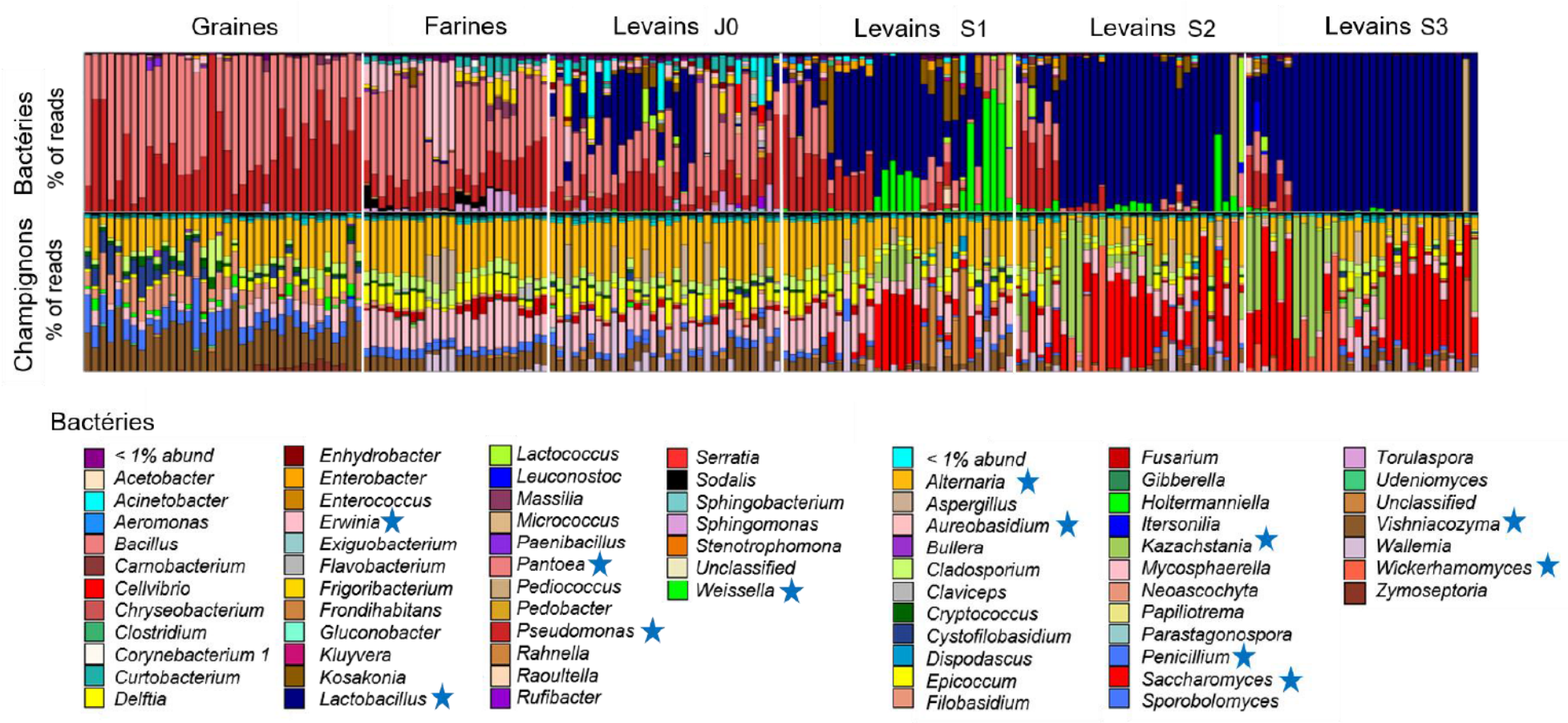


Figure 68. Représentation de la dispersion des bactéries et des champignons du grain à un levain mature

Les genres les plus retrouvés sont indiqués par une étoile bleue. En haut : représentation du flux bactérien. En bas : représentation du flux des champignons (moisissures et levures).

13) La fermentation (pousse de la pâte, densité des pains, largeurs et hauteurs de pain) est impactée principalement par les différences microbiologiques entre levains. La quantité de CO2 produit par les levains et l'acidité totale dépend principalement de la flore des bactéries et des levures et diffère selon les variétés (Figure 69).

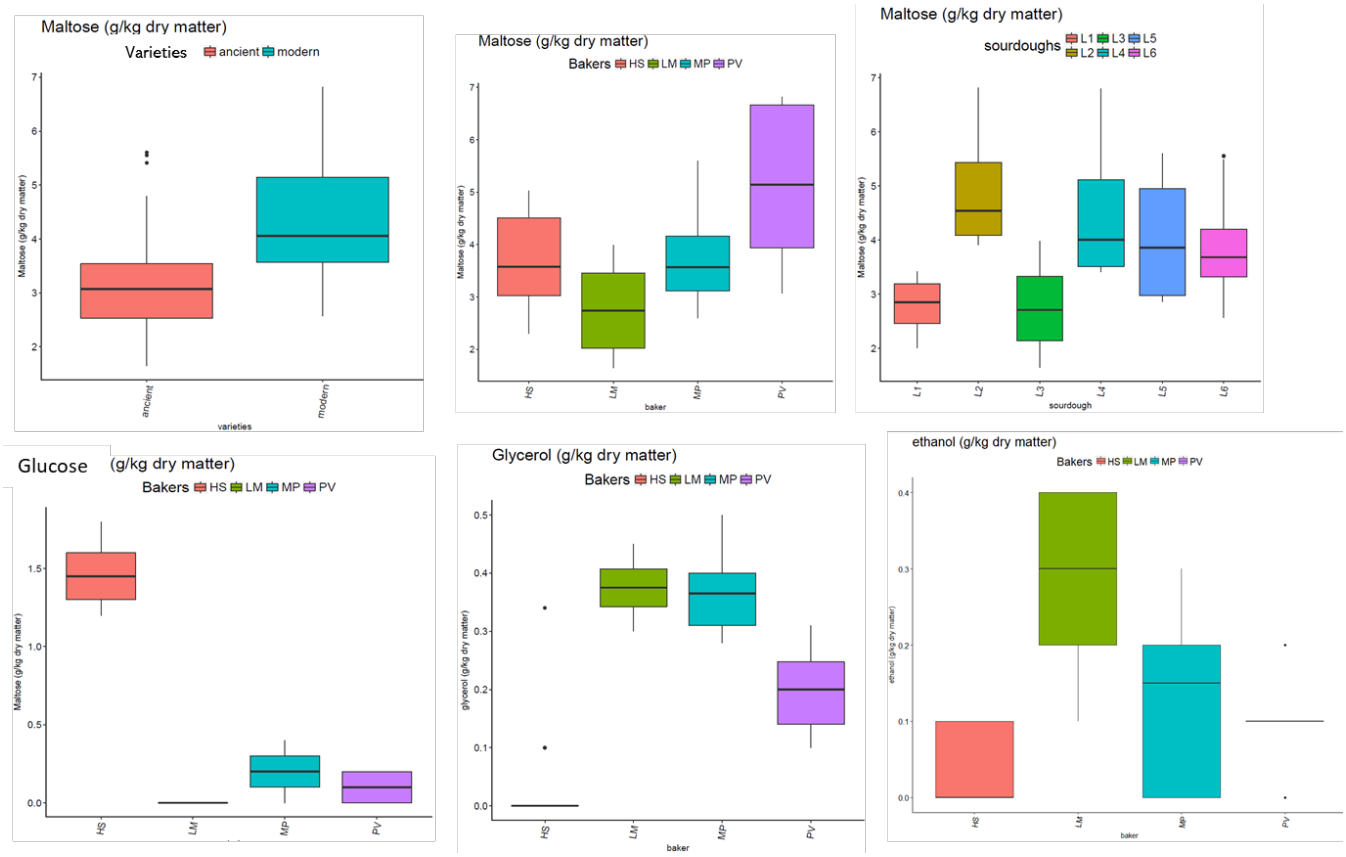


Figure 69. Graphiques représentant la consommation du glucose, maltose et la production de glycérol, éthanol en fonction des boulangers, des variétés et des farines

14) La teneur en minéraux des pains est impactée par le terroir (pour le magnésium et phosphore) et les variétés de blé (pour le calcium, cuivre, potassium). Le contenu en magnésium des pains dépend aussi des levains. Nous avons retrouvé plus de calcium et moins de cuivre dans les pains issus de blé de variétés modernes. Les résultats seront à confronter aux données agronomiques des sols où les blés ont poussés.

15) Photos ci-dessous des pains, des tranches de pains (Figure 70, Figure 71). Vous trouverez un récapitulatif des impacts sur chaque donnée étudiée (Table 38) et une représentation schématique du flux des microorganismes le long de la filière (Figure 72).

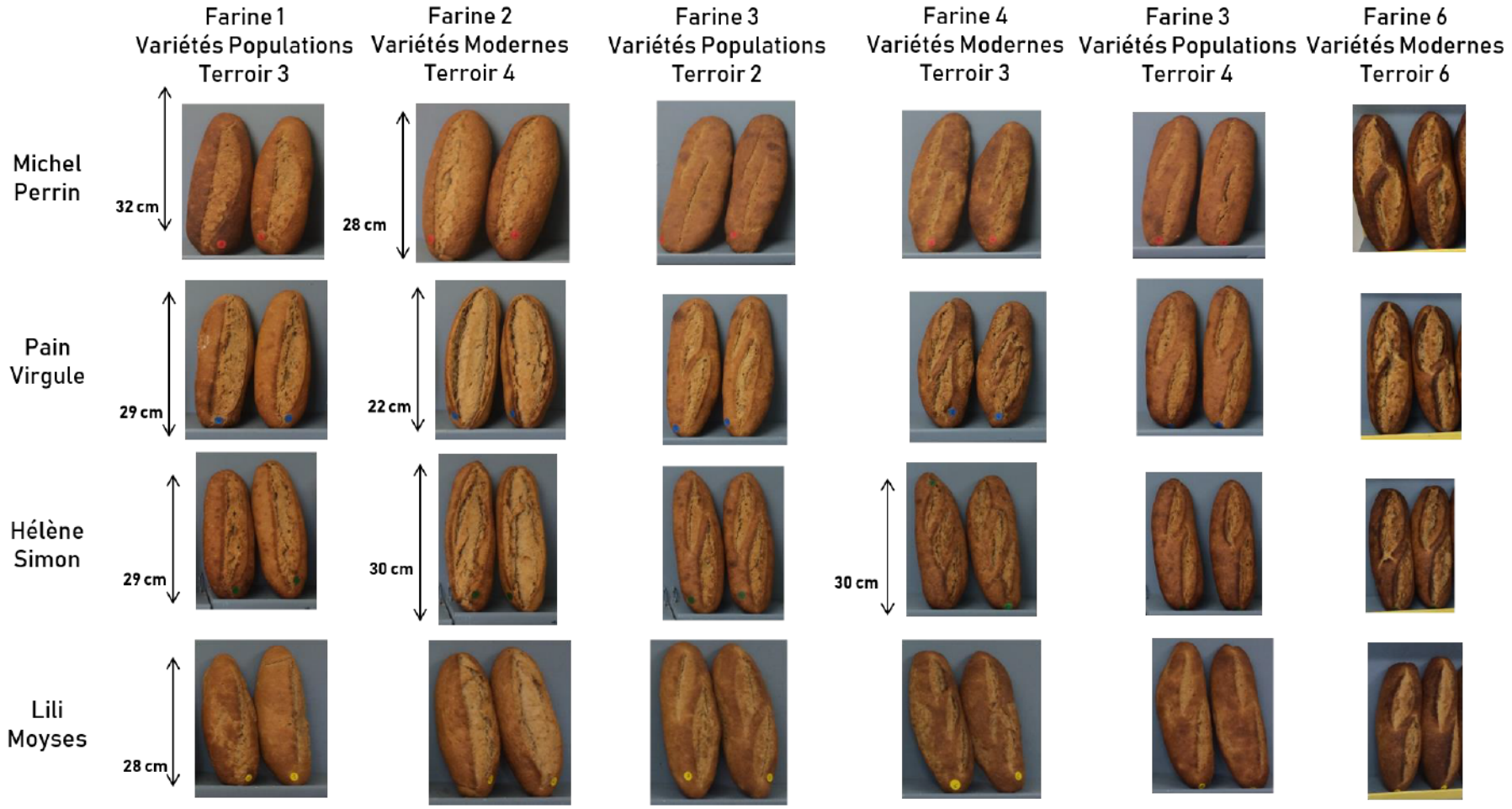


Figure 70. Photos des pains BAKERY

En ligne les boulangers et les farines issues d'un mélange de variétés d'un terroir

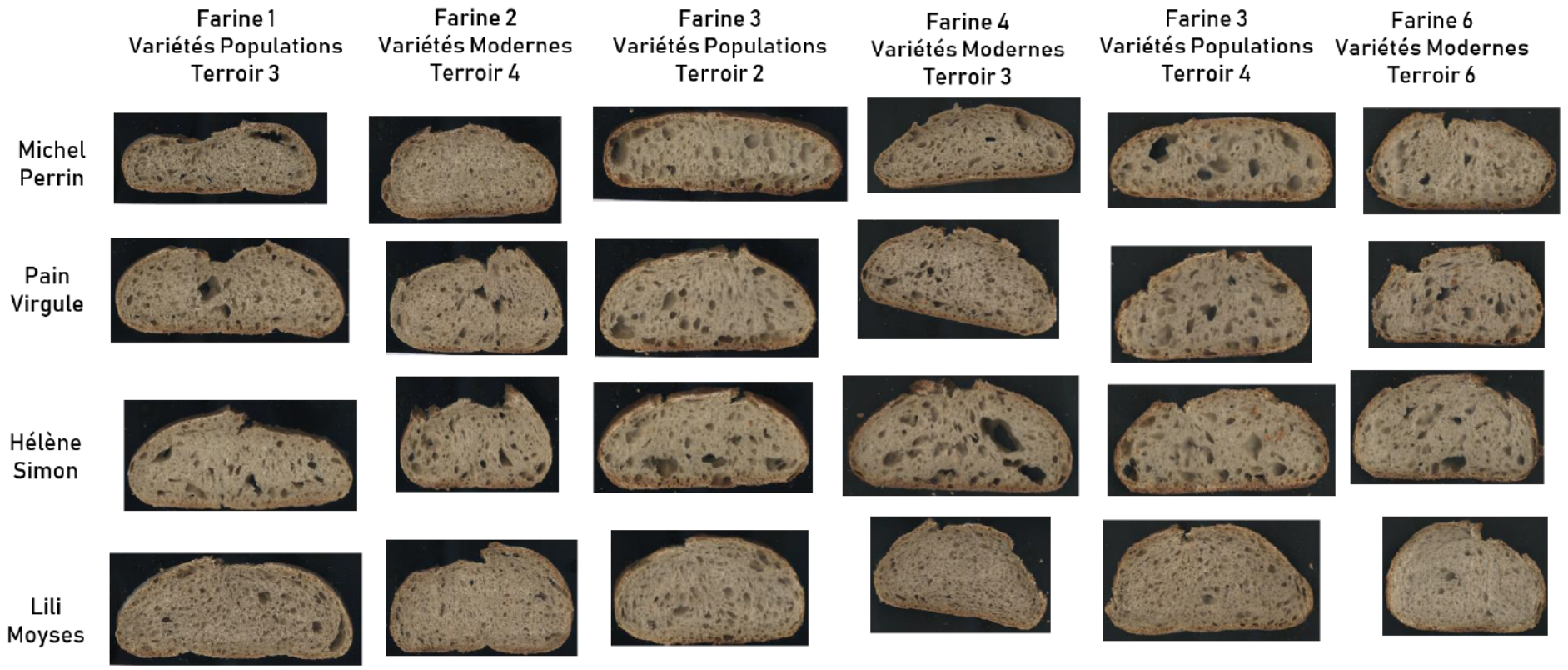


Figure 71. Photos des tranches de pain

B1 Michel Perrin, B2 Pain Virgule, B3 Hélène Simon, B4 Lili Moyses

	Terroir 	Variétés 	Boulangers, fournils 
Analyses propriétés physico-chimiques des farines		X	
Levains			
pH des levains			X
TTA des levains		X	X
Densité des levures dans les levains			X
Densité des bactéries dans les levains			X
Pousse de la pâte (observation visuelle)			X
Dimensions des pains			
Masse volumique des pains	X		X
Largeurs des tranches de pain	X	X	X
Hauteur des tranches de pain		X	X
pH des pains	X		X
Acide titrable totale des pains	X	X	X
Minéraux des pains			
Fer		X	
Zinc	X	X	
Calcium		X	
Magnésium	X	X	X
Cuivre		X	
Potassium		X	X
Sodium		X	
Phosphore	X	X	
Sucres et acides organiques des pains			
Glucose			X
Maltose	X	X	X
Fructose			X
Lactate	X		X
Acétate			X
Succinate		X	X
Glycérol	X		X
Ethanol		X	X
Analyses sensorielles			
Goût, arômes du pain	X	X	X

Table 38. Effets significatifs des facteurs qualitatifs (en colonnes) sur les variables quantitatives (en lignes).

Une croix (X) représente un effet significatif d'une p-value inférieure à 0.05, donc statistiquement significatif.

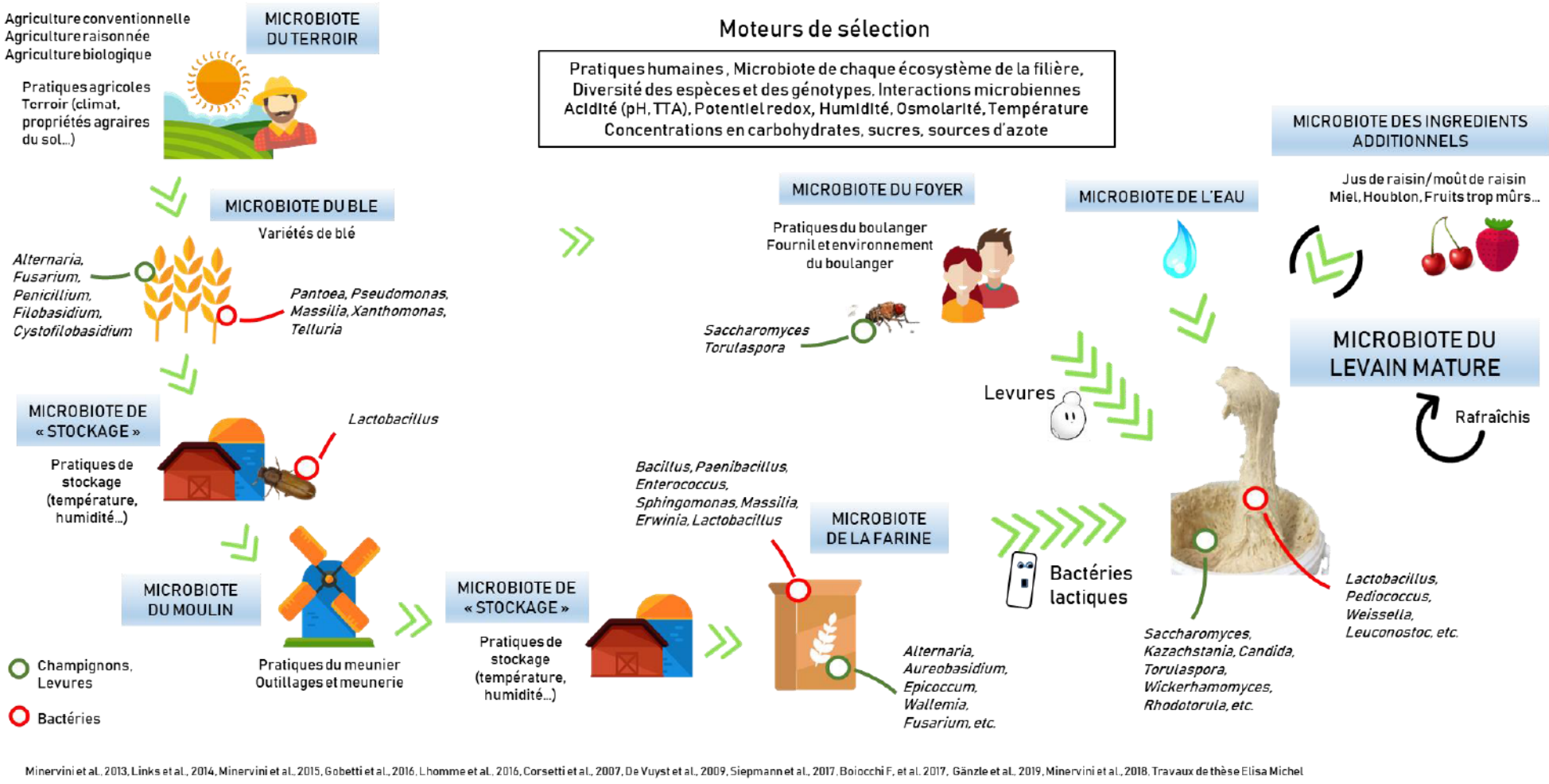


Figure 72. Flux microbiens le long de la filière boulangerie afin d'élucider l'origine des microorganismes du levain

D. Mieux se comprendre pour échanger les savoirs : exemple de la construction d'un glossaire

Glossaire terminologique de la fermentation en panification au levain

Acteurs dans la rédaction et à la lecture

Jean François Berthelot (paysan boulanger, RSP*), Marc Dewalque (boulanger, site internet « boulangerie.net »), Elisa Michel (étudiante en thèse pour le projet Bakery), Bernard Onno (Enseignant-chercheur, Oniris, Nantes), Philippe Roussel (Enseignant, Triptolème*), Delphine Sicard (chercheuse, INRA, Montpellier), Hélène Chaudy (paysanne boulangère), Rémi Bobier (artisan boulanger), Nicolas Supiot (paysan boulanger, Triptolème*)

* Triptolème, association membre du Réseau Semences Paysannes (RSP)

Abbréviations

(DS) Delphine Sicard, Johan Ramsayer (nov. 2015) Petit glossaire de microbiologie

(PF) Livre Les Pains Français (2002)

(PR) Philippe Roussel

(IG) Initiative Gluten (2017)

(DS et EM) Elisa Michel et Delphine Sicard

(BO) Bernard Onno

(RUPF) Recueil des Usages des Pains en France (1979)

(Tripto) Glossaire de l'association Triptolème issu du contrat Paysblé

Acides organiques (PR) : acides formés par des organismes. Ils sont considérés comme des acides faibles c'est-à-dire qui se dissocient plus difficilement qu'un acide fort. La dissociation, en milieu hydraté, du groupement acide (COOH), à l'extrémité de la molécule, en COO^- et H^+ contribue à diminuer la valeur du **pH**. (**p**otentiel **H**ydrogène). Dans les levains, on retrouve principalement de l'acide lactique et de l'acide acétique. La forme de l'acide, selon qu'elle est dissociée ou non, a un impact différent sur l'activité des microorganismes.

Activité microbienne d'un levain (BO) : Elle se traduit par une modification des caractéristiques du **levain** (acidification, gonflement, bulles, odeur, texture, …) qui peut être mesurée par le **pH**, l'acidité titrable totale (ATT ou TTA), la teneur en **acides organiques**, la pousse… Cette activité dépend de facteurs microbiologiques comme la densité microbienne, les **espèces** ou **souches** microbiennes présentes et de paramètres technologiques tels la température, le **type de farine**, l'hydratation…

Activité d'un levain :

- par l'observation (PR)



Lorsque le levain est « pâteux », par opposition à « liquide », l'activité s'apprécie par le niveau de développement de la pâte, avant qu'elle ne devienne poreuse, et dans des conditions de températures, d'hydratation et de consistance constantes.

Lorsque le levain est liquide, l'activité s'apprécie par la quantité de bulles de gaz qui se forme en partie supérieure de la pâte

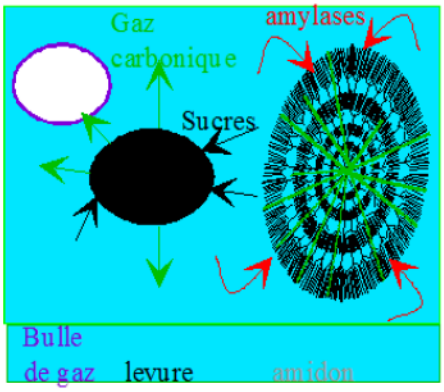
- par la mesure (BO) :

Dénombrement des **levures** et des **bactéries lactiques**, suivi des cinétiques de **pH** et de production gazeuse, dosage de l'acidité titrable, **mesure de la pousse**…

Activité de fermentation ou fermentative (PR) : Processus de transformation des substrats carbonés (sucres) par les microorganismes pour en retirer de l'énergie. Cette activité conduit à la libération de composés de dégradation comme le gaz carbonique (nécessaire pour assurer la levée de la pâte), des alcools (dont l'éthanol), des acides (lactique, acétique…)

L'activité fermentative augmente avec :

- ↗ de la quantité et de la viabilité des microorganismes (viabilité)
- ↗ de la température (↗ l'agitation moléculaire ⇨ ↗ de l'activité des **enzymes**) ;
- ↗ l'activité **amylasique** de la farine qui libère des substrats (maltose et glucose) fermentescibles ;
- ↗ de la proportion **d'amidons « endommagés »** (facilité l'accès et l'action des amylases dans le granule)
- ↗ des sucres préexistants de la farine ou ajoutés (dans les fabrications enrichies, on considère que l'activité augmente jusqu'à 5 % de la quantité de sucre incorporé par rapport à la farine)
- ↘ de la pression osmotique (↘ du sel et ↘ du sucre pour des doses > 10 %)
- ↗ de l'**hydratation** des pâtes (permet la dissolution de sucres et leur transfert vers les microorganismes)- lorsque que le **pH** est optimal pour les levures et les bactéries, entre 5 et 6

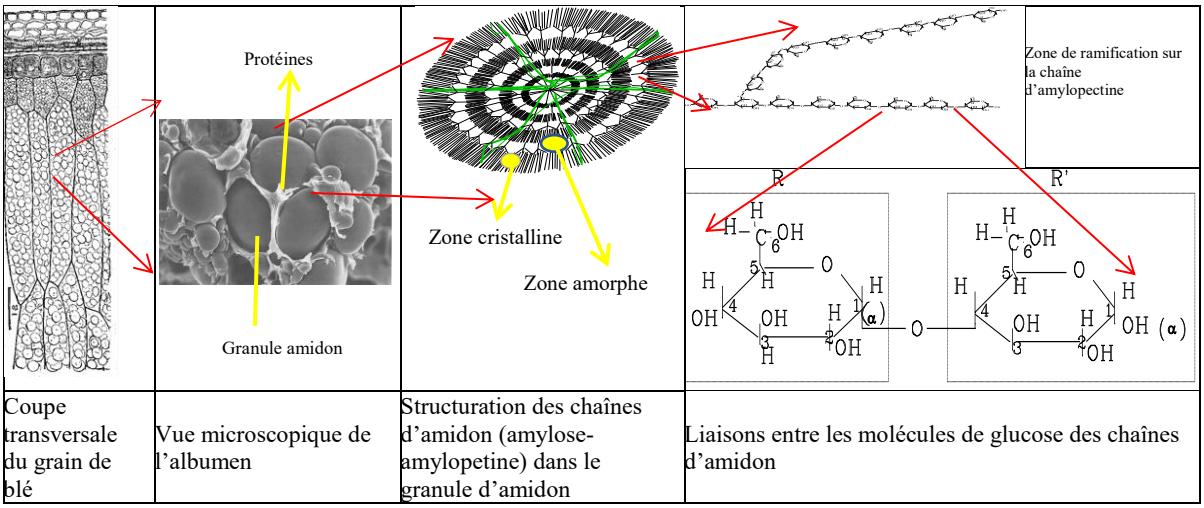


Albumen (PR) : Partie intérieure du grain de blé entourée par les enveloppes de la graine et du fruit

Amidon PR : Les chaînes d'amidon sont formées d'un enchainement de molécules de glucose par des liaisons α 1–4. Une chaine d'amidon peut être constituée de quelques centaines d'unités glucose.

La chaine peut être linéaire (amylose) ou ramifiée (amylopectine). Dans ce cas, la ramification se crée entre le carbone 6 d'une molécule de glucose et le carbone 1 d'une autre molécule (liaisons α 1-6), cette liaison entraine la perte du pouvoir réducteur du carbone 1. Dans l'ensemble, les chaines d'amidon ont un pouvoir réducteur faible.

L'amylose (100 à 300 unités glucose) et l'amylopectine (1000 à 5000 unités glucose) sont associées sous forme d'un granule appelé granule d'amidon ou amidon dont les dimensions, suivant les végétaux, se situent entre quelques micromètres (µm) et cent micromètre (100µm)



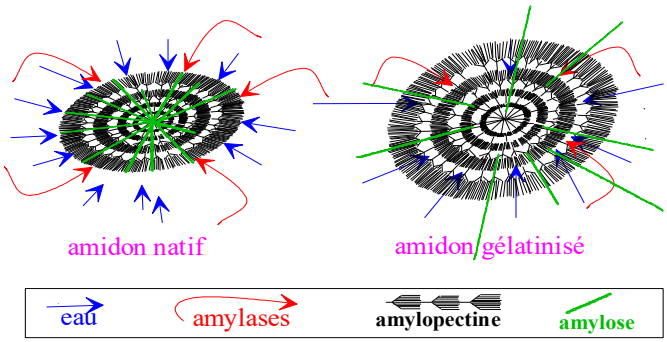
Coupe transversale du grain de blé	Vue microscopique de l'albumen	Structuration des chaînes d'amidon (amylose-amylopetine) dans le granule d'amidon	Liaisons entre les molécules de glucose des chaînes d'amidon

Amidons endommagés (PR) : Granules d'**amidon** de l'**albumen**, modifiés physiquement par les opérations de mouture (coupé par les effets de cisaillement, écrasés et fissurées par les effets de compression). Cet endommagement physique facilite la pénétration et la fixation de l'eau dans le granule, de ce fait, la consistance ou fermeté augmente, le boulanger corrige cet état par un ajout d'eau. La proportion d'amidons endommagés augmente lorsque la dureté de l'**albumen** est plus élevée.

Amidon (gélatinisation) PR :

Modification du grain d'amidon de l'état cristallisé vers un état amorphe sous l'effet de la température (↗ agitation moléculaire)

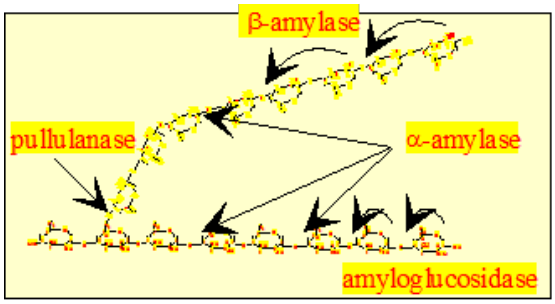
L'eau diffuse dans le granule, celui-ci gonfle, formation de liaisons entre chaînes, le milieu s'épaissit : il gélatinise



Amorphe (PR) : État d'association condensé désordonné de molécules de natures différentes ou identiques donnant des structures rigides vitreuses, déformables ou liquides. Lors du changement d'état de l'**amidon** pendant la **gélatinisation**, le passage d'un état cristallisé à un état amorphe va faciliter la fixation de l'eau et l'action des **amylases**.

Amylases, amylasique (PR) :

Type d'**enzymes** dont le rôle est l'**hydrolyse** des chaînes d'amidon. Parmi les principales, on distingue les α amylases dont l'action est considérée assez irrégulière dans les chaînes (endo-amylases) pour former des fractions de chaînes appelées dextrines et les β amylases dont l'action démarre des extrémités de chaînes (exo-amylases), et qui produit de manière méthodique une hydrolyse. Les deux glucoses équivalent à séparer une molécule appelée maltose.



L'activité amylasique augmente avec l'avancée du processus de germination, elle peut être appréciée par l'analyse au **temps de chute de Hagberg**

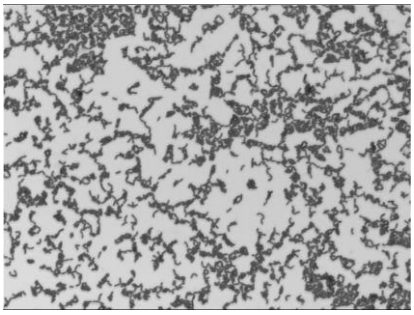
Amylolyse (PR) : Processus de coupure des chaînes d'**amidon** par l'action des **amylases** qui nécessite pour chaque réaction l'utilisation d'une molécule d'eau.

Apprêt (PF) : Etape de la **fermentation panaire** pour les pâtons façonnés se situant entre le façonnage ou la **tourne** et la mise au four. Synonyme : deuxième fermentation.

Artisan (wikipedia, PR) : en France, l'artisan est inscrit au répertoire des métiers et exerce une activité manuelle professionnelle à titre principal ou secondaire, à son propre compte n'employant pas plus de dix salariés. Il est souvent aidé de sa famille et d'apprentis qu'il forme.
C'est la loi 96-603 du 5 juillet 1996 qui définit l'entreprise artisanale indépendamment de l'artisan qui, lui, est défini par le décret 98-247 du 2 avril 1998. Ainsi l'entreprise artisanale n'emploie pas plus de dix salariés (mais il existe un « droit de suite » qui permet à une entreprise de rester artisanale en dépassant ce nombre) et couvre les activités de « production, de transformation, de réparation ou de prestation de service relevant de l'artisanat et figurant sur une liste.... » .La qualité d'artisan est reconnue aux personnes physiques qui justifient soit d'un certificat d'aptitudes professionnelles ou d'un brevet d'études professionnelles ou d'un titre homologué ou encore d'une immatriculation dans le métier depuis six années au moins. Les divers gouvernements, notamment à partir de 1969 développeront des politiques d'accompagnement de ce secteur de l'économie.

Autres professionnels des métiers d'art : l'artiste-auteur s'inscrit à l'URSSAF en profession libérale, ou au centre des Impôts et à la Maison des artistes s'il ne fait que de la création non utilitaire.

Les qualifications d'artisan, d'artisan d'art, de maître artisan et de maître artisan en métier d'art sont réglementées par l'article 21-I de la loi n° 96-603 du 5 juillet 1996 relative au développement et à la promotion du commerce et de l'artisanat, par le décret n° 98-247 du 2 avril 1998 relatif à la qualification artisanale et au répertoire des métiers, et par l'arrêté du 12 décembre 2003 fixant la liste des métiers d'art en France.



Artisan boulanger (PR) : personne qui exerce le métier de boulanger dans le cadre d'une structure artisanale inscrite à la chambre des métiers. Cette reconnaissance est attribuée à une personne qui justifie des compétences pour exercer ce métier***Bactérie lactique (BO) :*** Micro-organismes unicellulaires qui font partie des **espèces de bactéries** (règne des procaryotes, plus "ancestral" que les **levures**). Dans les **levains,** elles participent à la fermentation **homofermentaire** (acide lactique) et **hétérofermentaire** (acide lactique + acide acétique + CO_2) qui acidifient le **levain**. Elles y sont en général 10 à 100 fois plus nombreuses que les levures, mais leurs cellules sont aussi beaucoup plus petites (~ 10 à 50 fois plus petites). Il en existe aussi de nombreuses

espèces, principalement appartenant au genre *Lactobacillus*. L'espèce majoritaire des **bactéries lactiques** du **levain** est *Lactobacillus sanfranciscensis*.

Biodiversité (EM) : Terme qui désigne la diversité du monde vivant à 3 niveaux :

- Diversité génétique : est expliquée par la diversité des gènes des individus au sein d'une même espèce. Syn. diversité intra-spécifique

- Diversité des espèces : est expliquée par la diversité des espèces à l'échelle d'un écosystème. Syn. diversité inter-spécifique

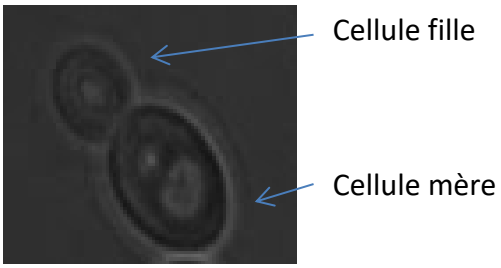
- Diversité des écosystèmes : diversité d'un ensemble d'espèces, ou un groupe fonctionnel d'espèces entre différents écosystèmes

Boulanger (PR) : personne qui fabrique ou vend du pain ; personne qui a les compétences et capacité pour exercer le métier de boulanger

Boulangerie (PR) : Peut seul prétendre à l'appellation et avoir l'enseigne de boulangerie (décret du 12/12/1995) l'établissement tenu par un professionnel assurant lui-même, à partir de farines choisies, les différentes phases de fabrication de pains : pétrissage, façonnage de la pâte, fermentation et cuisson sur le lieu de vente au consommateur final. Toutefois, cette dénomination peut également être utilisée lorsque le pain est vendu au consommateur final, de façon itinérante, par le professionnel qui a assuré sur le même lieu les opérations de pétrissage, de façonnage et de cuisson.

Cette définition ne précise pas le type de structure, celle-ci peut être industrielle, artisanale, boulangerie de grande surface et on peut le supposer aussi pour « boulangerie de ferme ».

Bourgeonnement des levures (DS) : Une grande partie des espèces de levure se multiplie par bourgeonnement. Une cellule mère bourgeonne pour donner une cellule fille. Une cellule mère peut donner plusieurs cellules filles. Chaque bourgeonnement laisse une cicatrice sur la paroi de la cellule mère. On peut compter le nombre de fille qu'une mère a eu en comptant le nombre de cicatrice.



Compétition (DS) : En écologie, on appelle compétition une forme d'interaction négative où deux espèces souffrent de la présence l'une de l'autre en terme de taille de population. En général, c'est à cause d'une compétition pour les ressources nutritives (les deux **espèces** mangent la même chose) ou pour l'habitat (les deux **espèce**s essayent d'occuper le même espace).

Consistance (PR) : résistance de la pâte à la déformation. Elle s'apprécie principalement au cours de pétrissage. Si la pâte résiste à la l'enfoncement des doigts dans la pâte, elle peut être qualifiée de ferme, dure ou résistante. Inversement, on la qualifie de molle, peu résistante, elle s'écoule facilement. Par extension, une pâte qui **relâche** ou qui s'écoule facilement et donc manque de **tenue** ou de stabilité peut être qualifiée de molle.



L'évolution de cette consistance en cours de pétrissage peut être différente suivant les farines ; elle sera jugée à nouveau en fin de pétrissage. En effet une consistance non conforme en fin de pétrissage n'est pas uniquement attribuable à une erreur d'hydratation. Un ajustement est éventuellement réalisé en ajoutant quelques pour-cent d'eau si nécessaire.

Au cours de la cuisson, le changement d'état de l'amidon par l'empesage ou la gélatinisation conduit à une augmentation de la consistance et assure la stabilité de la pâte au cours de cette opération. Avec la baisse de la température du pain après cuisson, l'augmentation de la résistance à la déformation de la mie (gélification) est associée à une augmentation de consistance et d'élasticité. Synonyme : « fermeté »

Consistance d'un levain (PR) : Par convention on définit la consistance au moment de la préparation ou du pétrissage du levain. L'échelle de consistance peut-être dure/ferme/mou/liquide. La consistance de départ n'est pas celle observée après fermentation, celle-ci diminue en fonction du degré d'**hydrolyse** des constituants.

Cristallisé (PR) : État d'association condensé ordonné entre des molécules de même nature sous forme d'une structure rigide (exemple la structure du sucre ou de la matière grasse cristallisé). Cette structure peut être désorganisée (état **amorphe)**, sous l'effet de l'agitation moléculaire provoqué par une augmentation de la température.

Croissance cellulaire ou microbienne (BO) : Développement par **multiplication** des microorganismes. La croissance microbienne comporte une phase de latence + ou – longue (adaptation au milieu et conditions), une phase exponentielle + ou – rapide (vitesse de croissance maximum), une phase stationnaire (arrêt de la multiplication du à un facteur limitant) et éventuellement une phase de déclin (diminution du nombre des cellules). Chaque phase peut être caractérisée par une variable : temps de latence, vitesse de croissance ou taux de croissance, nombre final de microorganismes. Cette croissance s'accompagne de la production de métabolites (acides, alcools, gaz…) en quantité variable selon les microorganismes et les conditions du milieu.

Croûte (PR) : Partie extérieure du pain qui se caractérise par une teneur en eau après cuisson faible qui la rend indéformable et donc propre à la rupture. Sa structure alvéolaire plus ou moins alvéolée lui confère des caractéristiques croustillantes et craquante

Déformation de la pâte (PR) : Modification de la forme de la pâte ou des pâtons provoquée par l'intervention manuelle (façonnage, observation des caractéristiques d'extensibilité et d'élasticité…), les opérations mécaniques (pétrissage…), les transformations biochimiques (fermentation…) et physiques (agitation moléculaire avec la baisse et l'augmentation de température…). Les sollicitations mécaniques imposées, compression (façonnage…), cisaillement (pétrissage, façonnage…) ou extension conduisent, en fonction de la vitesse de déformation, à des comportements à la rupture différents. Par exemple, une pâte de seigle peut avoir une bonne aptitude à la déformation en compression mais très limitée en extension (étirement). Dans ce cas, on peut dire qu'en extension la pâte est non ou peu **extensible**.

Dénombrement (voir numération)

Développement de la pâte (PR) : Augmentation de surface ou de volume d'une pâte, sous l'action des gaz de fermentation. Facteurs influant : production gazeuse, rétention gazeuse, aptitude à la **déformation de la pâte**. Synonyme : pousse, levée.

Division cellulaire (voir multiplication cellulaire)

Dureté du blé (PR) : Résistance de l'albumen du grain de blé aux sollicitations mécaniques (compression, cisaillement) lors de la mouture. Lorsque la dureté augmente le taux d'**amidons endommagés** augmente. Les variétés de blés anciens présentent en général un caractère moins dur « soft » (medium soft, soft ou very soft) que les variétés modernes « hard » (medium hard, hard ou very hard)

Dynamique d'une population (BO): Evolution de la taille d'une population au cours du temps. Dans les levains la taille d'une population de levure (ou bactérie) est mesurée en nombre de cellule / g de pâte.

Dynamique d'un levain (BO) : Cette terminologie peut correspondre à plusieurs notions :

- Au cours d'un rafraîchi, la dynamique d'un **levain** peut correspondre à la croissance microbienne ou **multiplication cellulaire** des microorganismes. Cette croissance va se traduire par une cinétique, reflet de l'activité d'un levain.
- Au cours de la vie d'un levain et des différents **rafraîchis**, la **dynamique** peut évoquer l'évolution au cours du temps des **populations** constituant le microbiote du levain en terme de genres et d'espèces

D'un point de vue technologique, la dynamique d'un levain peut qualifier la réactivité du levain, sa capacité à se développer.

Ecosystème (EM) : : Système formé par un environnement (le biotope) et par l'ensemble des organismes vivants (la biocénose) occupant cet environnement

Elasticité, élastique (PR) : Elle peut se définir aussi comme la capacité d'un corps à reprendre totalement ou partiellement sa forme après une déformation (extension, compression) donnée et l'arrêt de cette déformation. L'intensité de la résistance pour une déformation donnée permet ce retour total ou partiel à l'état initial.

Enzymes (PR) : Une enzyme est une grosse molécule protéique de structure généralement globulaire et capable de catalyser une réaction biochimique. On estime à environ 2000 enzymes le nombre existant dans la nature, chacune d'entre elles ne pouvant conduire qu'à un seul type de réaction sans être consommée dans la réaction, elles peuvent donc agir en permanence si les conditions favorables sont réunies. Parmi les classes d'enzymes, deux interviennent principalement dans la technologie boulangère :***les hydrolases*** (amylases, lipases, protéases, hémicellulases, pentosanases....), ces enzymes permettent la coupure des chaines ou de grosses molécules d'amidon, lipides, protéines, hémicelluloses,...; chaque réaction d'hydrolyse consomme une molécule d'eau et ***les oxydo-réductases*** (lipoxygénases, peroxydases, glucose-oxydase....).

Facteurs influençant l'activité enzymatique :

- *la concentration* en enzymes du milieu ;

- *la quantité de substrat* sur lequel agit l'enzyme ;

- *la quantité d'éléments* entrant dans la réaction (oxygène pour les réactions d'oxydation, l'eau pour l'hydrolyse, ...) ;

- *l'acidité ou le pH* du milieu : La modification des liaisons ioniques change la structure de la protéine ce qui influe sur son potentiel d'action

- *la température* : son élévation favorise l'activité enzymatique jusqu'au point de début de dénaturation ou de coagulation de cette protéine ; sa sensibilité à la dénaturation thermique baisse lorsque la teneur en eau du milieu diminue ;

- *l'activité de l'eau* : l'enzyme est plus active à forte Aw (eau solvante) à cause d'un meilleur contact enzyme-substrat, d'une meilleure mobilité, ceci est encore plus vrai lorsque les enzymes sont hydrosolubles.

Certaines enzymes comme les lipases, lipoxygénase, de nature hydrophobe sont plus actives lorsque l'activité de l'eau diminue ; ces deux enzymes sont donc actives dans les farines et contribuent à des modifications qualitatives associées au temps de plancher.

- *la force ionique* : en panification elle est influencée par la présence de sel (chlorure de sodium) dont la dissociation ionique modifie l'équilibre électrique de l'enzyme et donc sa structure. Généralement lorsque la force ionique augmente l'activité enzymatique diminue ;

- *le potentiel d'oxydo-réduction* : la structure tertiaire protéique de l'enzyme est aussi fonction des liaisons disulfures. La modification du potentiel d'oxydo-réduction modifie l'équilibre des liaisons et donc les possibilités d'action de l'enzyme.

***Espèce (DS)* :** Chez les micro-organismes, une espèce est un ensemble d'individus liés par des liens de parenté proches : ils ont donc un génome (ADN) et des caractéristiques morphologiques et physiologiques très similaires. Chez les **bactéries** il n'y a pas de reproduction sexuée. Chez les **levures**, ça dépend des espèces. Quand il y a de la reproduction sexuée, les individus d'une même espèce sont capables de se reproduire entre eux et donner des descendants eux même fertiles.

Espèces de levure (DS) : Trente espèces de levure ont été isolées de levains et sont listés sur le tableau ci-dessous. Toutes ces espèces sauf deux (les *Rhodotorula*) sont capables de fermenter le glucose et de le transformer en dioxyde de carbone. Ces espèces sont parfois aussi capables de fermenter d'autres sucres comme le sucrose, le galactose…. Pour chaque espèce de levure, une souche, dite souche type, représente l'espèce de levure pour tous les scientifiques du monde. Cette souche sert de référence. Les capacités fermentaires des souches types sont présentées dans le tableau ci-dessous. Attention les souches que nous avons isolées de levain peuvent avoir d'autres capacités à consommer les sucres que les souches type. Les deux espèces de *Rhodotorula* qui ne fermentent pas, sont très éloignées des autres espèces de levure génétiquement. Elles forment des colonies pigmentées orange/rouge que l'on voit parfois sur les toiles des bannetons. Liste des principales espèces de levures identifiées dans les levains des paysans et artisans boulangers + quelques éléments de caractérisation

	Glucose	Galactose	Sucrose	Maltose	Lactose	Raffinose	Trehalose
Candida carpophila	+		-				
Candida glabrata	+	-	-	-	-	-	v
Candida parapsilosis	+	v	v	v	-	-	v
Candida stellata	+	-	+	-	-	+	-
Candida tropicalis	+	+	v	+	-	-	+
Hyphopichia pseudoburtonii	+	w	+	+	-	w	w
Kazachstania barnettii	+	+	+	-	-	+	+
Kazachstania bulderi	+	+	+	-	-	+	
Kazachstania exigua	+	+	+	-	-	+	+
Kazachstania humilis	+	+	-	-	-	-	+
Kazachstania saulgeensis	+	+	+	-	-	+	+
Kazachstania servazzii	+	+	-	-	-	-	-
Kazachstania unispora	+	+	-	-	-	-	-
Lachancea kluyveri	+	+	+	-	-	+	-
Lodderomyces elongisporus	+	-	-	-	-	-	w
Pichia farinosa	+	v	-	-	-	-	v
Pichia fermentans	+	-	-	-	-	-	-
Pichia guilliermondii	+	v	+	-	-	+	+
Pichia kudriavzevii	+						
Pichia membranifaciens	v	-	-	-	-	-	-
Pichia norvegensis	+	-	-	-	-	-	-
Pichia occidentalis	+						
Rhodotorula aurantiaca	-	-	-	-	-	-	-
Rhodotorula mucilaginosa	-	-	-	-	-	-	-
Saccharomyces bayanus	+	v	+	+	-	+	-
Saccharomyces cerevisiae	+	v	+	v	-	+	-
Saccharomyces uvarum	+	+	+	+		+	
Saccharomycopsis fibuliger	non testé	non testé	non testé	non testé	non testé	non testé	non testé
Torulaspora delbrueckii	+	v	v	v	-	v	v
Wickerhamomyces anomalus	+	v	+	v	-	v	-

Table 39. Liste des principales espèces de levures identifiées dans les levains des paysans et artisans boulangers + quelques éléments de caractérisation

Espèces de bactéries (EM, DS, BO) : Les différentes **espèces** de bactéries lactiques sont donc classées soit **homofermentaires**, soit **hétérofermentaires** obligatoires et soit hétérofermentaires facultatives (capacité à adopter les deux types métaboliques selon les substrats). Il existe plusieurs genres de bactéries lactiques parmi lesquels : *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*… Le principal genre des bactéries lactiques des levains est *Lactobacillus*. Au sein de ce genre les principales espèces sont parmi les hétérofermentaires obligatoires *L.sanfranciscensis*, *L. brevis*…, les hétérofermentaires facultatives *L plantarum* et les homofermentaires, tel *L. casei*… L'identification des bactéries fait appel à des méthodes de biologie moléculaire (séquençage région de l'ADN pour le 16S). Ces méthodes ont permis l'identification de nouvelles espèces (cf.tableau Bactéries Lactiques).

	Homofermentaire	Hétérofermentaire facultative	Hétérofermentaire
Lactobacillus sanfranciscensis			X
Lactobacillus plantarum		X	
Lactobacillus xiangfangensis			X
Lactobacillus brevis			X
Lactobacillus heilongjiangensis			X
Lactabacillus curvatus		X	
Lactobacillus paralimentarius		X	
Lactobacillus pontis			X
Lactobacillus diolivorans			X
Lactobacillus paracasei		X	
Lactobacillus parabuchneri			X
Leuconostoc citreum			X
Leuconostoc mesenteroides			X
Pediococcus pentosaceus	X		
Pediococcus parvulus	X		
Weissella confusa			X
Lactobacillus hammesii			X
Lactobacillus lindneri			
Lactobacillus sakei		X	
Lactobacillus spicheri			X
Lactobacillus koreensis			X
Lactobacillus rossiae			X

Table 40. Liste des principales espèces de bactéries identifiées dans les levains des paysans et artisans boulangers de Bakery + quelques éléments de caractérisation

Extensibilité, extensible (Tripto) : Il s'agit de l'appréciation des capacités d'allongement ou de **déformation** de la pâte**,** généralement jusqu'à un stade de rupture. Cette aptitude à la déformation ou extensibilité est corrélée avec les propriétés visqueuses (**consistance** ou fermeté) et **élastiques** de la pâte. Elle dépend aussi du type de sollicitation (étirement, compression, cisaillement) que l'on effectue et de la vitesse de cette déformation. L'extensibilité se mesure par étirement continu (mouvement rectiligne, uniforme et vertical) de la pâte jusqu'à sa rupture (extension dans un seul axe de déformation appelée extension uniaxiale).

Malgré des difficultés de jugement dues en particulier au type de pétrissage (mécanique, manuel…), on peut considérer que le caractère normal est défini pour une rupture correspondant à un étirement de 20

à 30 cm pour du pain français. Pour des longueurs d'étirement inférieures à 20 cm, le défaut est noté « insuffisant ». Inversement, il est noté en « excès » pour des longueurs supérieures à 30 cm. La quantité de pâte étirée et la vitesse d'étirement peuvent modifier le jugement. Il est nécessaire de standardiser cette opération, en soulevant une quantité de pâte sensiblement constante avec le bout des doigts.

L'appréciation de l'extensibilité peut être complétée par l'appréciation du niveau d'épaisseur et de la régularité d'un film de pâte (extension sur plusieurs axes appelée extension bi-axiale).



Figure 73. Mesure de l'extensibilité par étirement de la pâte (extension uniaxiale) et appréciation de l'extensibilité par la formation d'un film (extension biaxiale)

Facilitation (DS) : C'est une forme d'interaction positive où une espèce facilite par sa présence la vie d'une autre **espèce**. En générale parce que la première modifie l'environnement physico-chimique d'une façon qui est favorables à la seconde. Cela peut-être par la libération de nutriments dans l'environnement comme c'est souvent le cas entre micro-organismes. Mais un arbre qui permet grâce à son ombre à une autre espèce de vivre à son pied est aussi une forme de facilitation.

Façonnage (PR) : Terme utilisé pour décrire la mise en forme des pâtons de forme longue. Il comprend une succession d'opération de compression, pliage, étirement, allongement pour donner la forme définitive au pâton

Farine de blé (PR)

Table 41. Tableau de composition d'une farine type 55

Composants	Composition en % par rapport à la matière sèche
Glucides	
Amidon	80-85
Sucres simples (glucose, maltose…)	1,5-2,0
Pentosanes	2,5-3,5
Cellulose	0,2-0,3
Protides	9-13
Lipides	1-1,5
Sels minéraux	0,55-0,6

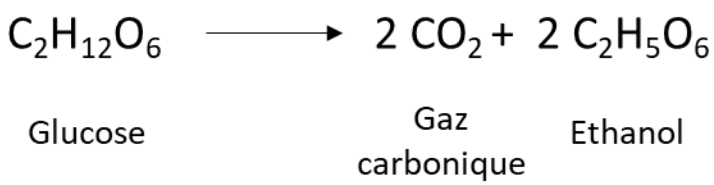
Farine céréalière (PR) : Produit pulvérulent fin ou grossier provenant de la mouture des grains de blé et d'autres céréales. Certaines farines sont classées réglementairement par « **types** », définis sur la base de **teneurs en cendres** (blé et seigle) en lien avec leurs taux d'extraction par rapport au grain entier avant mouture

Ferment (BO) : Désigne le plus souvent une préparation commerciale destinée à ensemencer un produit à fermenter.

Fermentation panaire (PR) : Mécanismes de **fermentation alcoolique** et **lactique** qui se produisent dans une pâte céréalière destinée à la fabrication du pain et qui conduisent à la levée de la pâte

Fermentation alcoolique (DS) :

Transformation du glucose en gaz carbonique, éthanol, acide acétique, glycérol, par les levures



Fermentation lactique (BO) : Les bactéries dites lactiques sont dénommées ainsi en raison de la production d'acide lactique au cours de leur multiplication. Les **bactéries lactiques** sont anaérobies ou anaérobies facultatives. A partir de substrats carbonés (hexoses : glucose, maltose… ou pentoses : xylose…), les bactéries lactiques produisent, soit essentiellement de l'acide lactique par la voie **homofermentaire**, soit un mélange d'acide lactique, d'acide acétique - ou d'éthanol - et de dioxyde de carbone (CO_2) par la voie **hétérofermentaire**.

Fermentation naturelle (PR) : Expression utilisée dans l'article 4 du décret pain Français de 1993 pour désigner une fermentation dont les microorganismes sont issus d'une fermentation d'une pâte formée de farines, d'eau et éventuellement de sel, avant une incorporation éventuelle de 0,2 % de levure dans la pétrissée. Les précisions du BID (n°12/1992) sur les allégations dans le secteur alimentaire (ref 92.483 étiquetage, DG 716) concernant l'utilisation du terme naturel précise que le terme "naturel" ne peut être appliqué qu'à un produit que l'on trouve dans la nature ou aussi proche que possible de son milieu d'origine, non traité et ne comportant que des constituants normaux sans additif, ni résidus ou corps étrangers. Cette définition ne permettrait donc pas de considérer une fermentation du levain, initiée par des microorganismes volontairement ajoutés, comme **fermentation naturelle**.

Fermeté (Tripto) : C'est l'état de **consistance** de la pâte. Synonyme : « viscosité »

Fibres (PR) : Les fibres des céréales sont composées de chaînes glucidiques de type cellulose, β glucanes, pentosanes solubles et insolubles. Parmi ces fibres, les pentosanes ont une forte affinité avec l'eau et contribuent à environ 1/4 à 1/3 de l'eau d'**hydratation** de la pâte.

Force (de la farine) (PR) : Aptitude des farines à s'**hydrater**, puis des pâtes à se développer tout en retenant le gaz carbonique formé pendant la fermentation. On la mesure à l'Alvéographe Chopin par l'indicateur W qualifié de force boulangère. Un blé est dit « de force » lorsque le W est élevé souvent supérieur à 300 ; les blés meuniers actuels ont souvent des valeurs comprises entre 160 et 240 ; les variétés anciennes ont souvent des valeurs de W inférieures à 150.

Force (en boulangerie) (PF) : Caractéristiques physiques d'une pâte à un moment donné pendant la panification. Cet état de la pâte est fonction de son **élasticité**, de sa **tenue** et de son **extensibilité**. Ces caractéristiques physiques sont souvent associées à la **force fermentative** (pousse, rapidité de la levée, **activité de la fermentation**).

Force (manque de) (PF) : Excès d'**extensibilité**, manque de **résistance élastique** et de **tenue**.

Force (prise de) (PR) : Evolution des caractéristiques physiques de la pâte au cours de la panification se manifestant par une perte de souplesse et d'**extensibilité**, et par une augmentation d'**élasticité** et de **tenue** (phénomène d'**oxydation** du gluten). Dans les diagrammes de fermentation au levain ou avec de

faibles doses de levure la prise de force semble très associée avec l'**activité fermentative** de la pâte. L'hypothèse avancée est que les réactions d'oxydation assurant l'augmentation de la résistance élastique du gluten ne peuvent se produire que si la pâte est en mouvement. La mise en mouvement est directement est liée à la **force fermentative** ; une pâte (biscuitière ou pâtissière) sans levure ne prend pas de force.

Force (trop de) (PF) : Excès d'élasticité et de tenue au détriment de la souplesse et de l'**extensibilité**. Le boulanger emploi aussi l'expression « trop de corps ».

Force fermentative (BO) : Elle est le résultat de l'activité et de la croissance microbienne. Elle se traduit par une cinétique de fermentation qui peut être caractérisée par une vitesse, une concentration en métabolites (acides, CO_2), mesurée par le **pH**, l'acidité, la pousse qui vont traduire la « force fermentaire ».

Fournée (PR) : Quantité de pains fabriqués par pétrissée ou par unité de cuisson.

Frasage (PR) : Phase de mélange des ingrédients avant la structuration de la pâte au cours du **pétrissage** qui s'effectue en vitesse lente à la main ou au pétrin, dont l'objectif principal est le passage de l'état pulvérulent de la farine à un état pâteux. L'eau diffuse entre les particules de farine, et les associe. La diffusion de l'eau dans les particules dissocie les granules d'amidon et fait gonfler les agrégats protéiques qui se lient pour former le **gluten**. L'air s'échappe progressivement, mêmes si des inclusions d'air restent piégées dans la pâte.
Pendant cette opération le boulanger détermine la **consistance** de sa pâte et effectue si nécessaire les corrections par ajout d'eau (bassinage) ou de farine.

Gène (DS) : région déterminée de la séquence d'ADN qui code pour une protéine. Les **protéines** sont les « artisans » de la cellule. Elles transforment une molécule en une autre, ou sont impliqués dans le transport d'une molécule d'un endroit à l'autre…

Génétique (DS) : Science qui étudie l'hérédité et les **gènes** et qui s'intéresse donc à la transmission au cours des générations.

Génome (DS) : Ensemble de l'information génétique d'une cellule

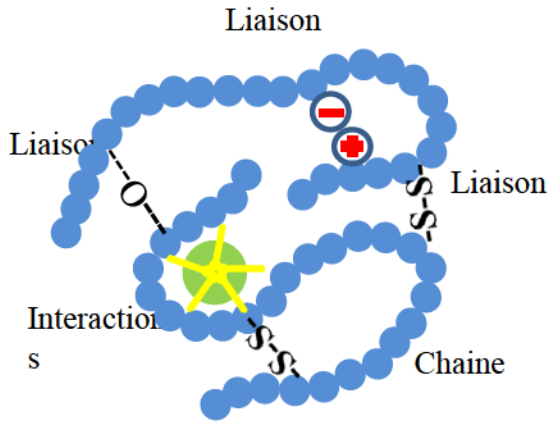
Génomique (DS) : Méthode d'analyse des génomes.

Genre (DS) : Les espèces sont regroupées en genre. Les espèces qui appartiennent au même genre sont plus proches génétiquement que celles qui appartiennent à des genres différents. Le genre est donné par le premier nom d'une espèce. Par exemple l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* est du genre Saccharomyces. L'espèce de blé tendre, *Triticum aestivum*, est du genre *Triticum*.

Génotypique et phénotypique (DS et EM) : Le génotype est l'ensemble ou une partie de l'information **génétique** d'un individu. Toutes les cellules d'un même individu ont en général le même génotype. Le phénotype correspond à l'expression du génotype. Le phénotype est caractérisé par les caractéristiques qu'on observe ou mesure, comme la taille d'une cellule, la vitesse de production de CO2, la capacité à produire une vitamine, ou un arôme…

Gluten (PR-IG) :

Le terme « gluten » tient son origine du latin « glutinum » qui signifie lien, ou colle et, seules les **protéines** du blé ont cette propriété de s'associer ou de se coller ensemble en présence d'eau. Le gluten n'existe pas en tant que tel dans la farine, il se forme en présence d'eau dans la pâte. Le gluten du blé assure ainsi la formation d'une structure continue protéique qui est capable de retenir des gaz de **fermentation** permettant la **levée** de la pâte dans la fabrication du pain. Cette propriété donne au blé le qualificatif de panifiable.



Le gluten de blé est une association complexe, élastique et variable de **protéines** de hauts poids moléculaires en milieu hydraté, par des liaisons polaires ou hydrophiles (avec l'eau), des interactions hydrophobes (avec les matières grasses), des liaisons ioniques, certains atomes sont chargés électriquement + et – (liaisons avec les éléments chargés comme le sel, les acides…) et des liaisons d'oxydation entre molécules de cystéine (liaisons à forte énergie). La diversité des types de protéines et des liaisons entre ces protéines contribuent à donner des caractéristiques qualitatives différentes des pâtes boulangères. Si le terme « gluten » est historiquement spécifique au blé tendre et au blé dur, d'autres céréales sont aussi concernées : seigle, avoine, orge, triticale, Kamut (blé de Khorasan) notamment lorsque l'on appréhende l'intolérance et l'hypersensibilité à ce composant.

Gluten humide (PR) : Masse (en grammes) élastique insoluble dans l'eau obtenue après lixiviation d'une pâte de farine de blé sous un filet d'eau. La quantité de gluten humide s'exprime en pourcentage par rapport à la farine utilisée pour la réalisation de la pâte. Attention, cela ne veut pas dire que le **gluten** représente ce pourcentage calculé dans cette farine, cela veut dire que les protéines de la farine sont capables de former une proportion de gluten après hydratation. Il est possible de sécher le gluten et ainsi exprimer une proportion réelle par rapport à la farine. L'appareil « Glutomatic » qui permet de réaliser une extraction du gluten humide comprend un ensemble d'outils pour mesurer un niveau de résistance du gluten par la valeur du **Gluten Index**.

Gluten index (PR) : Passage forcé, par centrifugation du gluten humide à travers un tamis. Lorsque le taux de passage est important, l'index tend vers la valeur 0. Inversement pour un passage impossible, l'index prend la valeur 100, il est lié à un fort niveau d'agrégation, signe d'une **résistance élastique** élevée. Avec les blés anciens, le gluten est moins résistant, il est qualifié de « plus mou».

Homofermentaire et hétérofermentaire (BO) : A partir de substrats carbonés (hexoses : glucose, maltose … ou pentoses : xylose…), les **bactéries lactiques** produisent soit essentiellement de l'acide lactique par la voie homofermentaire , soit un mélange d'acide lactique, d'acide acétique - ou d'éthanol - et de dioxyde de carbone (CO_2) par la voie hétérofermentaire. Les différentes espèces de bactéries lactiques sont donc classées soit homofermentaires, soit hétérofermentaires obligatoires et soit hétérofermentaires facultatives (capacité à adopter les deux types métaboliques selon les substrats). Les réactions bilans s'écrit en se basant sur les molécules mises en œuvre. Pour le substrat carboné, il est d'usage de partir du glucose

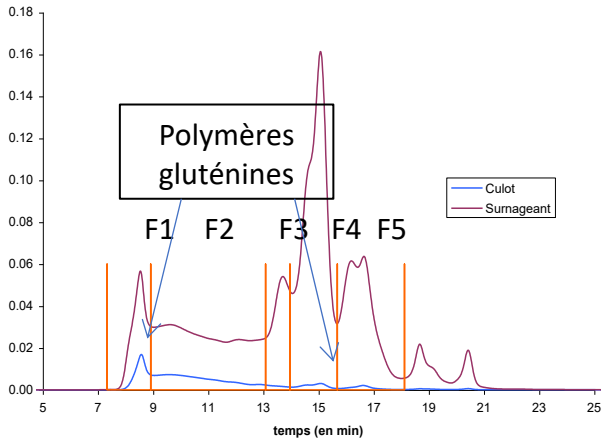
Bilan des réactions :

Métabolisme Homofermentaire : Glucose ⟶ Acide lactique

Métabolisme Hétérofermentaire : Glucose ⟶ Acide lactique + CO_2 + Acide acétique + Ethanol

HPLC-SE (PR) : Méthode chromatographique de séparation par tamisage moléculaire de composés biochimiques appliquée aux **protéines**.
La solubilisation et la sonication permettent de séparer les protéines en fonction de leurs poids moléculaires par dissociation des liaisons inter-chaînes à faible énergie (polaire, interactions hydrophobes, ioniques), excepté les liaisons inter-chaînes covalentes.

Cinq fractions protéiques sont identifiées. Les fractions F1 et F2 correspondent aux agrégats **protéiques** de haut et faible poids moléculaire de type glutélines ; les gliadines de hauts et bas poids moléculaire sont associées aux fractions F3 et F4 ; les F5, plus petites les albumines et les globulines..



L'allure de la courbe et l'analyse des proportions de ces différentes fractions apportent des éléments pour la différenciation de la valeur d'utilisation des variétés de blé.

Hydratation, hydrater (PR) : Incorporation de l'eau dans le pétrin avant ou sur la farine, au début du **pétrissage** à la période du **frasage**. L'eau d'hydratation est appelée aussi eau de coulage

Hydratation (capacité) (PR) : Capacité d'absorption d'eau d'une farine pour une consistance souhaitée. Elle est fonction principalement du pourcentage de **protéines,** de **fibres** et de la fraction d'**amidons endommagés**.

Hydrolyse (PR) : Résultat de l'action d'une **enzyme** de type hydrolase dont l'action est de scinder ou de couper (lyse) des chaines complexes de glucides, protides ou lipides en utilisant les molécules d'eau

Levain (DS, BO, PR) **:**

- Ecosystème composé de bactéries lactiques, de levures en interaction et de farine et d'eau. C'est le siège d'une activité enzymatique complexe

- Terme générique utilisé dans différents secteurs d'activité (panification, brasserie, produits laitiers fermentés…) pour dénommer un milieu préfermenté servant à ensemencer une fabrication. En panification, c'est une pâte préfermentée pouvant être décrite comme un écosystème microbien céréalier complexe constitué de levures et de bactéries lactiques sur un milieu à base de farine.

- Le Recueil des Usages des Pains en France, indique pour levain : « Pâte en fermentation à réaction acide, provenant au départ de d'un mélange de farine et eau, sans apport de volontaire de levures et perpétuée à partir de ce mélange, une fois qu'il a subi une fermentation spontanée, par des additions conduites de façon méthodique.

Ces « **rafraîchissements** » successifs provoquent la sélection de la flore microbienne des levains qui est constituée par la symbiose de bactéries acidifiantes lactiques et « acétiques » et de levures ».

- Dans les pratiques boulangères, le démarrage du levain peut être initié par des associations avec la farine de blé, de farines céréalières, des sons ou remoulages et une proportion de jus de fruits en mélange ou non avec de l'eau.

Levain chef (PR RUPF) : Portion de pâte prélevée issue du levain ou sur une fournée de panification du jour (conduite sans addition volontaire de levure industrielle) qui sert de base de départ à la préparation du levain tout point utilisé comme agent fermentatif. La partie restante du levain est conservée, son activité est maintenue régulièrement par des rafraîchis. Synonyme : chef, levain mère.

Levain de pâte (PR RUPF) : Fraction de pâte boulangère pétrie et conservée pour être introduite dans une **pétrissée** ultérieure afin d'en assurer la fermentation. Elle contient en général du sel, qui peut avoir une action sur la flore microbienne.

NB : Dans le langage courant de boulangerie, elle contient généralement de la ***levure*** *de boulangerie et ne peut donc être utilisée dans une panification au levain naturel. L'activité de ce levain diminue lorsque les pétries se succèdent, la tentation d'ajouter un peu de levure pour maintenir son activité s'est faîte très tôt et s'est généralisée au 20ème s. On parle aussi de « vieille pâte » ou « pâte de la veille».*

Levain de première (PR RUPF) : Il résulte de la **fermentation** obtenue en incorporant des doses judicieuses de farine et d'eau au **levain chef**

Levain de seconde (PR RUPF) : Il résulte de la **fermentation** obtenue en incorporant des doses judicieuses de farine et d'eau au **levain de première**

Levain jeune (PR) : pas trop acide, levain peu déstructuré, aspect lisse

Levain mère (PR): terme équivalent à levain chef***,*** utilisé pour relancer le levain

Levain passé (PR) : plus que vieux mais récupérable

Levain sec : préparation commerciale aromatique obtenue par déshydratation d'un levain préparé sur différentes bases de farine. C'est un ingrédient aromatique utilisé dans une pâte pour l'apport d'arômes. Le type de farine et le procédé de préparation permet de typer le levain du point de vue profil aromatique. Il est en général inactif, mais contient dans certains cas des ferments ajoutés après séchage.

Levain stabilisé (PR) : Levain dont l'activité a été rééquilibrée à un niveau d'activité considéré comme normal par le boulanger

Levain tourné (PR) : trop aigre… texture, odeur, activité…

Levain tout point (PR RUPF) : Levain préparé pour assurer la fermentation d'une pétrissée. Par une succession de rafraîchis, on augmente progressivement la quantité de levain à partir d'un levain chef tout en maintenant son activité microbienne.

Lorsque le levain tout point est obtenu :

- après un seul rafraîchi à partir du levain chef, on parle d'un travail sur un levain. Pratique que l'on rencontre chez les paysans boulangers adaptée pour une fournée journalière.

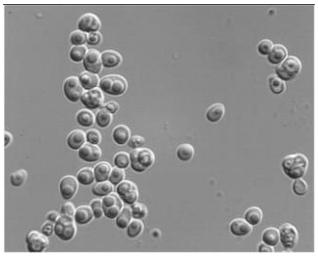
- après deux rafraîchis à partir du levain chef, on parle d'un travail sur deux levains, le rafraîchi intermédiaire est appelé levain de première. Forme de travail qui s'est développée avec une fermentation levain/levure

- après trois rafraîchis à partir du levain chef, on parle d'un travail sur trois levains, les rafraîchis intermédiaires sont appelés levain de première et levain de seconde. Forme de travail souvent retenue pour un nombre de 2 à 3 fournées par jour.

Le travail sur deux ou trois levains donne un état de pâte moins hydrolysé que sur un levain ce qui peut compenser une activité microbienne plus faible des levains, sur le développement du pain

Levain vieux (PR) : trop acide, affaissement de la structure

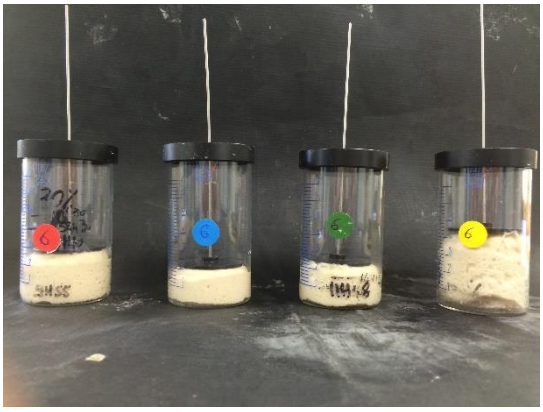
Levure (DS) : Micro-organismes unicellulaires qui font partie des champignons. Dans les levains, elles sont principalement responsables de la **fermentation** alcoolique qui transforme certains sucres (glucose, maltose, saccharose) en alcool tout en dégageant le CO2 qui permet au levain puis à la pâte de monter. Il en existe de nombreuses **espèces**.



Levure de boulangerie (PR) : La levure de boulangerie correspond à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* obtenue par multiplication en levurerie sur mélasse sucrière. Son fonctionnement est légèrement différent des espèces qui se sont multipliées dans un levain issu d'une fermentation spontanée et naturelle.

Métabolisme, Métabolique (PR) : Ensemble des réactions chimiques dans une cellule ou un organisme vivant et qi peuvent conduire soir à la production de nouveaux composants (métabolite), soit à la dégradation de composants

Mesureur de pousse (PR)



Verre cylindrique gradué généralement en cm, recouvert dans sa partie supérieure ; le diamètre de ce récipient est souvent déterminé de façon à obtenir une valeur de 20 cm^3 pour une hauteur de 1 cm. Il comprend un disque cylindrique sur lequel est soudée une tige souple, les deux éléments ayant une masse déterminée et qui doit être constante, si l'on utilise plusieurs mesureurs. La levée de la pâte ou la **pousse** déplace le disque qui permet de visualiser de manière plus précise le niveau de développement. Le développement de la pâte est fonction de la production gazeuse (**activité du levain** ou de la levure de boulangerie) mais aussi de la rétention gazeuse (**porosité** de la pâte) et de la résistance élastique de la pâte.

Métagénomique (DS & EM) : Méthode **culture indépendante** d'analyse des génomes directement à partir d'un échantillon de l'environnement, sans passer par l'isolement de chaque organisme vivant. C'est une méthode dite semi quantitative car elle ne permet pas de connaitre précisément les proportions de chaque **espèce** mais donne une idée des espèces dominantes et des espèces rares.

Métagénétique (DS) : La méta-génétique est une méthode culture indépendante pour caractériser la diversité des **espèces** microbiennes d'un **écosystème**. On dit qu'elle est culture indépendante car elle ne nécessite pas d'isoler des souches de **bactéries** ou de **levures** une à une du levain. L'ADN est extrait directement du levain et donc de toutes les espèces microbiennes du levain en même temps. Un gène ou une région d'un gène est ensuite amplifié et séquencé à partir de cet ADN. On obtient ainsi un grand nombre de séquence qui proviennent des différentes espèces microbiennes du **levain**. Ces séquences sont assignées à des espèces sur des bases de données, ce qui permet de connaître la composition en espèce du levain.

Métabarcoding/ Le métabarcoding (DS) : Méthode similaire à la méthode de **métagénétique**. A la place d'un gène, c'est un barcode qui est séquencée. Le barcode peut-être une région d'un gène ou une région entre les gènes (intergénique).

Microbiote (DS & EM) : ensemble des microorganismes d'un environnement donné

Microbiome (DS) : En anglais, le terme microbiome fait référence à l'ensemble des génomes du **microbiote**. En français il est parfois utilisé pour parler de l'ensemble des génomes du microbiote mais il peut aussi vouloir dire « le biome » du microbiote c'est-à-dire son lieu de vie.

Mie (PR) : Partie intérieure du pain qui se caractérise par une teneur en eau suffisante, après cuisson, pour la rendre déformable. Sa structure alvéolaire plus ou moins alvéolée lui confère des caractéristiques souples et/ou fermes.

Multiplication cellulaire (BO) : Résultat de la division cellulaire d'organismes vivants. Pour les microorganismes du levain **levures** se multiplie par bourgeonnement et les **bactéries** lactiques par scissiparité (division binaire).

Mutualisme (DS) : C'est une autre forme d'interaction positive, au même titre que la facilitation. Mais dans le cas du mutualisme, les deux espèces impliquées bénéficient mutuellement de la présence l'une de l'autre alors que la facilitation ne va que dans un sens

Numération, (BO) : Méthode de quantification des microorganismes d'un **levain** par mise en culture sur milieu sélectif ou non. L'échantillon est dilué puis ensemencé sur un milieu adapté pour la flore recherchée (**levures**, **bactéries lactiques**) et mis en incubation pour permettre la croissance et la visualisation des cellules par formation de colonies. Les colonies formées sont comptées et le résultat du dénombrement, tenant compte des dilutions effectuées est exprimé en Unité Formant Colonies (UFC) / g.

A noter que :

- les milieux et conditions de culture peuvent influencer le développement des microorganismes,
- il existe des microorganismes qui sont viables mais non cultivables (VNC) ;
- donc les résultats de dénombrement sont donc, en général, relativement imprécis et sous évalués ; notamment pour les bactéries lactiques.

Oxydation, oxygénation, oxygène (PR) : L'air contient de l'oxygène, on associe donc aération d'une pâte à une oxygénation. L'oxygène apporté va conduire à des réactions d'oxydation, catalysées principalement par des **enzymes**. Parmi les principales réactions qui vont être déterminantes en panification, il y a celles qui entrent dans le fonctionnement **respiratoire** des microorganismes et celles qui vont se produire sur des composés de la farine : oxydation des pigments caroténoïdes ayant pour conséquences le blanchiment des pâtes, oxydation des protéines responsable de la **prise de force** des pâtes, oxydation des matières grasses qui conduit au rancissement, oxydation de la vitamine E.

Pétrissage (PR) : Le pétrissage correspond principalement au développement, et à l'orientation des protéines du **gluten**, en fonction des types de sollicitations mécaniques (compression, cisaillement, extension) et du régime d'écoulement de la pâte. Il impacte directement la quantité, la répartition et la stabilisation de l'air dans la pâte. Un pétrissage dit intensif conduira, par rapport à un pétrissage avec peu d'énergie dispersée, à une quantité d'air incorporée plus forte et une dispersion plus régulière de l'air dans la pâte. Il préfigurera des structures de mie avec de nombreuses alvéoles, petites et régulières (mie mousseuse et moelleuse) et une **croûte** plus fine et croustillante. En panification au levain, le pétrissage, généralement peu intensif, va donner une structure alvéolaire avec moins d'alvéoles, plus irrégulières aux parois plus épaisses, donc une **mie** et une **croûte** plus ferme. A des intensités de pétrissage, des quantités et qualités de gluten et consistance identiques, les différences de structure de mie et de croûte seront impactées par l'**activité de fermentation**.

Pétrissée (PF) : Quantité de pâte à pétrir ou pétrie, généralement destinée à une fabrication de pains. Synonymes : venue (biscotterie et biscuiterie), pétrie.

pH (potentiel Hydrogène) ***(PR) :*** Indice associé à l'activité de l'ion hydrogène H^+ dans une solution ou un milieu hydraté, libéré, par exemple dans la pâte, par les **acides organiques**. Si l'activité est forte, cela correspond à une dissociation importante des ions H^+ et la valeur de pH sur une échelle de 1 à 14, se situera entre 1 et 7, la valeur 7 étant le point neutre entre le caractère acide et basique (pH supérieur à 7). Il existe donc un lien, inversement proportionnel, entre cette activité potentielle de l'hydrogène et la mesure de l'acidité totale (TTA) sauf que cette activité peut être réduite si l'hydrogène se lie avec certains constituants, on parle d'effet tampon. Ainsi dans la fermentation au levain, la présence de protéines en quantité plus forte dans les parties périphériques du grain augmente l'effet tampon, le pH diminue moins vite que l'augmentation de l'acidité

Plancher (PF) : Temps de repos des farines entre la mouture et la fabrication du pain. Autrefois ce temps de repos des farines se réalisait par un entreposage des sacs de farine sur des surfaces de plancher du moulin. Pendant cette durée de repos, la farine s'oxyde : oxydation des pigments caroténoïdes (blanchiment de la farine) et oxydation des protéines (prise de force des pâtes).

Pointage (PR) : Période de **fermentation** panaire « en masse » ou « en cuve » se situant entre la fin du pétrissage et le premier pain **tourné**. Durant cette étape, le boulanger est très attentif à la **pousse** de la pâte, à la prise de force de la pâte et à la **porosité** de celle-ci. Dans un schéma de panification à la levure, où la densité des levures est forte la pousse est rapide et importante ; en panification au levain, cette pousse est un indicateur visuel de la reprise d'activité microbienne et permet une prédiction du développement de la pâte pendant l'**apprêt**. Parallèlement, à l'activité microbienne, la pâte acquière une meilleure stabilité et plus de **résistance élastique** ; ce phénomène de prise de **force**, lié à des phénomènes d'**oxydation** des protéines est dépendant de la poussée gazeuse. A même température, à même durée et à même intensité de pétrissage (importance de l'oxygénation), une pâte prend plus rapidement de la force si l'activité de **fermentation** est plus forte. S'il apparaît dans cette étape un déséquilibre entre une fermentation un peu trop rapide et une prise force insuffisante, l'excès de gaz conduira à des risques de déchirement ou de porosité de la pâte et l'action de **rabat** de la pâte s'impose. Synonyme : piquage

Poolish (PF) : Culture de levure de boulangerie sur un mélange composé généralement de moitié farine et moitié eau, et subissant une fermentation avant introduction dans une pétrissée.

Porosité, Poreux (PF) : Pâte présentant en surface de multiples petits trous, signes de ruptures dans sa structure ; son aptitude à la rétention gazeuse est mauvaise.

Pousse (PR) : La pousse désigne, soit un niveau de développement de la pâte, liée à la production et la rétention gazeuse, à l'élasticité et l'extensibilité de la pâte, soit une vitesse de développement (pousse rapidement ou lentement), soit une forme que prend la pâte en cours de développement (pousse rond ou plat)

Pousse lente(PF) **:** Vitesse de fermentation lente, technique de fermentation ralentie par le froid, la zone de température peut varier entre 10 °C et 18 °C.

Pousse plat (PF) : Aspect plat ou relâché de la pâte en fermentation, synonyme d'un manque de force et de tenue.

Pousse rond (PF) : Aspect arrondi de la pâte en cours de fermentation. Pendant le pointage en cuve ou en bac, la pâte après pétrissage qui se trouve dans un état relâché (plat), acquiert progressivement de la force, cela se traduit pendant cette fermentation par l'apparition d'un aspect arrondi de la partie supérieure, synonyme d'une amélioration de sa tenue ou de sa stabilité et de sa résistance élastique. La forme plus ou moins arrondie de la pâte peut être qualifiée de « assez rond », « rond », « très rond », ce qui est associé au degré de prise de force.

Procédé de panification au levain : On associe procédé à la conduite de travail et à la manière de faire. L'activité des microorganismes dans un levain étant réduite par rapport à une utilisation directe de levure, il est nécessaire d'optimiser cette activité tout en favorisant au maximum les capacités de rétention gazeuse et de déformation de la pâte

⇒ Rafraîchis rapprochés pour l'élaboration d'un **levain tout point** moins hydrolysé

⇒ Pâte douce (molle), qui pousse plus facilement

⇒ Pâte chaude 26-28 °C

⇒ **Pointage** assez long 1 h 30 à 3 h (volume de pâte sensiblement multiplié par 2)

⇒ **Apprêt** 1 h 30 à 3 h (volume de pâte sensiblement multiplié par 3)

⇒ Cuisson dans un four à sole épaisse pour favoriser l'expansion des gaz et favoriser le volume du pain

Rôle des étapes de fermentation

Préparation du levain tout point	Première fermentation après pétrissage : « pointage »	Deuxième fermentation après façonnage : « apprêt »
↗ de la quantité de levain pour les besoins de la fabrication du pain ↗ activité des microorganismes	↗ de la prise de force ↗ du développement du réseau de gluten ↗ activité des microorganismes	↗ le volume des pâtons avant enfournement, assure la production favorable au développement du pain
↗ les composés aromatiques et de l'acidité	↗ des composés aromatiques	↗ des composés aromatiques
La durée de fermentation déterminée en fonction de l'activité du levain et de l'état d'hydrolyse ou de la porosité de la pâte	Déformation irrégulière de la structure alvéolaire formée au pétrissage	Déformation irrégulière de la structure alvéolaire formée au pétrissage si la fermentation est longue

Protéines (PR) :

Les protéines sont des substances organiques composées de carbone, d'oxygène, d'hydrogène, d'azote, auxquelles peuvent s'ajouter des éléments minéraux comme le soufre. Elles se présentent sous forme de molécules élémentaires appelées acides aminés. La liaison entre deux acides aminés se fait par condensation entre le groupement amine d'un acide aminé et le groupement acide d'un autre acide aminé pendant la synthèse des protéines.

Ce type de liaison appelé liaison peptidique conduit à la formation de protéines ou chaînes polypeptidiques. Cet enchaînement peut atteindre plusieurs centaines d'acides aminés dont l'association suit une certaine séquence (ordre de positionnement des acides aminés).

La nature des acides aminés qui composent une protéine, la configuration et les différents types de liaisons existants donnent aux protéines des propriétés physiques et fonctionnelles très variées et notamment la formation du **gluten**.

Protéines (types) (PR) : Familles de protéines classées suivant leurs poids moléculaires et leur solubilité. Traditionnellement, les protéines sont classées par leurs caractéristiques de solubilité. Osborne au début du XXème siècle proposait une division des protéines en quatre types, les albumines, les globulines, les prolamines et les gluténines.

- les albumines: (solubles dans l'eau). De forme globulaire, elles peuvent être dénaturées par la chaleur (exemple, les protéines ou ovalbumine du blanc d'oeuf). Les albumines du blé représentent environ 5 à 10 % des protéines totales, elles sont concentrées surtout dans la périphérie du grain et dans le germe.

- les globulines: (solubles dans les solutions salines diluées) : De forme globulaire. Dans le blé, elles représentent 5 à 10 % des protéines totales et se concentrent comme les albumines dans les parties périphériques de la graine.

- les prolamines ou gliadines: (solubles dans les solutions alcooliques) : Dans le blé, elles représentent 40 à 50 % des protéines totales et se concentrent surtout dans l'amande ou albumen du grain. On les retrouve dans le gluten et apportent à ce produit ses caractéristiques visqueuses (fluidité, extensibilité). Leurs poids moléculaires varient de 35000-40000 (bas poids moléculaires) à 90000 (hauts poids moléculaires).

- les glutélines ou gluténines: (solubles dans les solutions d'acides ou d'alcalis) : Avec 30 à 40 % des protéines totales, elles assurent au gluten ses caractéristiques élastiques, sa cohésion et sa résistance aux déformations. Leurs poids moléculaires peuvent varier de 1 à 3 millions. Comme les gliadines, on les trouve principalement dans l'albumen du grain. Actuellement la séparation des protéines se fait surtout par chromatographie de type HPLC

Rabat (PR) : Action qui consiste au cours du pointage à plier une pâte pour la dégazer, sans la déchirer. Cette opération va éviter une extension trop importante de la structure gluténique au cours de la fermentation et permettre une reprise de cohésion de la pâte, ce qui se traduit par une augmentation sa résistance élastique. On constate aussi une division des alvéoles de gaz qui impacte la structure alvéolaire de la mie du pain. Cette pratique peut signifier pour le boulanger : « redonner de la force ». Synonymes : rompre ou donner un tour, si l'opération se fait dans le pétrin.



Phases de dégazage et de pliage dans l'opération du « Rabat » (Tripto)

Rafraîchir, rafraîchis, rafraîchissements (PR) : Opération qui consiste à réactiver et/ou à maintenir l'activité microbienne d'un levain en ajoutant de la farine céréalière et de l'eau dans des proportions permettant de redonner ou maintenir la consistance du levain, de diminuer la concentration en alcool et acides et d'apporter une aération et une ré-oxygénation de la pâte et un apport de substrats pour l'activité des microorganismes.

La durée de fermentation nécessaire pour redévelopper et stabiliser l'activité microbienne dépend de la proportion du levain dans le rafraîchi, de la composition de la farine (taux de cendres, …), des températures (ambiance, eau), de la consistance et de la concentration en ions (éléments chargés électriquement comme les minéraux contenus dans l'eau ou le sel ajouté).

Reproduction cellulaire (DS) : la reproduction cellulaire, aussi appelé **division cellulaire**, consiste à faire deux cellules à partir d'une. Chez les **bactéries** elle se fait par simple division en deux de la cellule et partage de l'information génétique qui s'est répliqué (ADN). Chez les **levures** des **levains**, elle se fait par **bourgeonnement**, avec aussi partage de l'information génétique après sa réplication.

Relâchement, relâché (PF) : Phénomène d'écoulement de la pâte. Le réseau de gluten n'est pas suffisamment résistant pour maintenir la pâte dans sa forme primitive. Voir : tenue.

Résistance élastique (Tripto) : Elle est associée au niveau de résistance permanent pendant une succession de petites déformations, correspondant à une intensité élastique et elle permet d'en apprécier la capacité de rétraction de la pâte. Termes ou expressions associés : « ça revient ou pas »



Visualisation au pétrissage du retour élastique de la pâte après un étirement (déformation)

Respiration (PR) : transformation complète du glucose en milieu oxygéné

Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux cellules de subir une multiplication avec un rendement cellulaire élevé (le rendement étant défini par le quotient de la quantité de cellules fabriquées par le substrat sucré consommé : soit pour 1 g de levure environ 2 g de sucre (aérobie) et 20 g de sucre (anaérobie)

$$C_2H_{12}O_6 + 6\ O_2 \longrightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

Glucose Oxygène — Gaz carbonique Eau

Réveiller un levain (PR) : réactiver un levain en état de « *dormance* » en jouant sur les facteurs environnementaux (température, hydratation,….) ou par rafraîchi

Séquençage (EM) : L'information génétique (ADN pour Acide DésoxyriboNucléotidique) est composée d'une succession de nucléotide (A, T, G, ou C). C'est uniquement l'ordre et les répétitions de ces quatre nucléotides (A, T, G, C) qui fait la spécificité de notre information **génétique**. Le séquençage consiste à déterminer l'ordre de la succession des nucléotides d'un barcode, d'un **gène**, d'une région, de gène ou d'un **génome**.

Souche (DS) : Au sein d'une **espèce** il existe quand même de la variabilité **génétique**, morphologique ou physiologique. Une souche est une population de cellule qui vient d'une même cellule ancêtre commun par reproduction asexué (bourgeonnement pour les levures, division pour les bactéries). Une souche est donc un ensemble de cellule identique aux mutations près. Chez les micro-organismes, une souche est en quelque sorte l'équivalent d'une "variété homogène" pour les plantes cultivées.

Starters : Préparation commerciale composée de microorganismes actifs, sélectionnés, concentrés et stabilisés (séchage, congélation, lyophilisation), en culture pure (1 souche), mixte ou complexe, destinée à ensemencer un produit à fermenter.

Taxonomie (EM&DS) : branche de la biologie qui a pour objectif de regrouper les organismes vivants et les nommer. Science qui classe et nomme les espèces.

Temps de chute de Hagberg (de la farine) (PR) : Méthode pour déterminer l'intensité de l'activité **amylasique** de la farine. Elle est basée sur la mesure de **consistance**, en cours de gélatinisation, de la

farine. Si l'activité **amylasique** est forte, l'intensité de l'**hydrolyse** est élevée et la consistance diminue en conséquence. Une valeur d'activité élevée pour des farines types 55 est inférieure à 200 secondes et une activité faible se situe à des valeurs supérieures à 350 secondes.

Teneur en cendres (de la farine) (PR) : Méthode pour déterminer la classification des farines (types de farine) dont le principe est l'incinération des farines à des températures élevées (méthodes à 550 °C ou à 900 °C). Le résidu ou cendres est formé de minéraux **oxydés**. La concentration en minéraux étant forte dans les enveloppes du grain, leur dosage permet donc de déterminer le niveau de blancheur de la farine ou de sa proportion d'enveloppes. Du type 45 à 150, on passe de la farine la plus blanche à la plus « piquée » donc plus riche en enveloppes du grain (taux d'extraction en farine, élevé).



Tenue (Tripto) : Il s'agit de l'écoulement de la pâte sous son propre poids, ce qui correspond à une tenue insuffisante de la pâte. La tenue et la fermeté dépendent de la viscosité, mais il n'y a pas de corrélation parfaite entre ces deux mesures. Les défauts de tenue sont toujours notés en « insuffisance » ; l'absence de relâchement, prenant en compte un léger affaiblissement après une déformation, est considérée comme le caractère « normal ». Synonyme : relâchement

Tolérance d'une pâte (PR) : Capacité d'une pâte à supporter des écarts de conditions de fabrication (température, durée…) sans modifications significatives de ces caractéristiques physiques (tenue, élasticité, extensibilité, collant)

Tolérance d'un levain (PR) : Capacité d'un levain à supporter des écarts de conditions de fabrication (température, durée…) sans modifications significatives de son **activité** microbienne

Tonicité d'une pâte ***(PR, Triptolème)***:

L'aspect tonique de la pâte peut-être associé à la vigueur, à l'énergie. Cette énergie non dissipée dans la pâte au cours du pliage pendant l'opération de **rabat** ou de façonnage l'amène à être réactive, ce qui va se traduire par une force de nature élastique qui la conduit à se rétracter partiellement mais de manière instantanée **(élasticité**) et dans un deuxième temps à rester plus stable après pliage (**tenue**)

Tour (donner un tour) (PR, RUPF) : Quand la durée de pointage est longue ou lorsque la pâte manque de force, il est opportun de provoquer la rupture de la pâte par un tour de pétrin qui entraîne : l'évacuation du gaz carbonique formé au sein de la pâte dont le volume est ramené à son volume initial ; l'augmentation de la **résistance élastique** de la pâte. Cette opération restitue, pour un temps, à la pâte sa capacité de rétention gazeuse

Tourné, tourne (PR) : mise en forme ronde ou légèrement allongée de la pâte qui ne nécessite pas un **façonnage**. Dans les anciens schémas de panification, au levain notamment, la tourne est l'étape qui se situe entre la division et l'apprêt

Type de farine de blé (PR) : La classification française des farines (types de farine) est basée sur leurs **teneurs en cendres**. Elle est associée à la notion de pureté ou de blancheur (peu d'enveloppes du grain).

Types de farine	teneur en cendres ou matières minérales (% ramené à la matière sèche)	Aspect des farines
45	< 0,50 %	
55	0,50 % à 0,60 %	blanches
65	0,62 % à 0,75 %	
80	0,75 % à 0,90 %	bises
110	1,00 % à 1,20 %	
150	> 1,40 %	complètes

Variétés de blé anciennes, modernes et de population (PR, EM) : Les variétés modernes sont inscrites au Catalogue des semences, les variétés modernes non inscrites.

Semences paysannes = variétés populations. Ce sont des populations dites « évolutives », composées de mélanges d'individus sélectionnés en sélection naturelle (pollinisation libre) ou en sélection massale (l'agriculteur choisit les plantes). Dans le cas du blé tendre, espèce fortement autogame, il y a peu de pollinisation croisée et les populations sont alors essentiellement composées de mélanges d'individus homozygotes. Ces individus se ressemblent au niveau morphologique (hauteur, couleur, présence de barbes,…) et phénologique (précocité). La diversité génétique au sein de la population varie en fonction de la biologie de la reproduction de l'espèce, de l'histoire de la variété et des pratiques de sélection/conservation à la ferme (Source INRA).

E. Une levure de paysan-boulanger porte le nom de la commune de Saulgé

Michel et Dominique Perrin[1], Elisa Michel[2] et Delphine Sicard[2]

[1] Les Plants, Saulgé, 86500

[2] Unité mixte de recherche 1083 SPO, INRA, Montpellier, 34000

Dominique et Michel Perrin, paysans-boulangers à la ferme des Plants, à Saulgé produisent leur blé à partir de variétés anciennes et modernes en agriculture biologique. Ils produisent leur farine avec une meule de pierre (type Astrié) et l'utilisent fraîche pour faire du pain au levain naturel dans un vieux four à pain du milieu du XIX^{ième} siècle.

Dominique et Michel participent à un projet de recherche participative, appelé BAKERY* et animé par l'INRA, qui a pour objectif d'étudier la diversité des levains et des pratiques boulangères et paysannes. Ce projet vise à comprendre la magie de la transformation de la pâte (farine + eau) en pain grâce au levain naturel.

Mais qu'est-ce que le levain naturel ? C'est un mélange de farine, d'eau, de bactéries, de levures présentes naturellement sur les grains de blé, dans l'air, les équipements du fournil, …Les bactéries et les levures consomment le sucre de la farine et le transforment en différents composés. Les bactéries produisent de l'acide lactique et de l'acide acétique qui acidifient le pain. Les levures transforment le sucre en gaz carbonique et permettent la pousse du pain. Les bactéries et les levures se multiplient au cours de la fermentation.

En analysant la diversité des bactéries et des levures des levains français, les chercheurs ont montré que les boulangers et paysans-boulangers maintenaient une diversité d'espèce jamais rencontrée ailleurs. Ils ont découvert deux nouvelles espèces de levure, dont une dans le levain de Dominique et Michel. Cette espèce s'appelle *Kazachstania saulgeensis*, du nom de Saulgé, leur commune. Sa découverte fait avancer nos connaissances et les recherches sur l'écologie microbienne et sur la diversité des pains.

*http://www6.inra.fr/bakery/

https://www.lanouvellerepublique.fr/vienne/commune/jouhet/une-levure-unique-au-monde-inventee-a-saulge

Chapitre VI. Discussion générale

Le pain est un aliment central dans l'alimentation française et d'une importance culturelle, historique et religieuse. Depuis les années 1980, le pain au levain connaît un regain de popularité grâce aux consommateurs à la recherche de l'authenticité et du goût du pain (Calvel, 1981). Manger du *vrai* pain est devenu un moyen de se réapproprier son alimentation, de maîtriser et de savoir ce que l'on mange. Grâce à la réaction de la profession, le consommateur retrouve le goût pour les pains d'autrefois, profitant d'un pétrissage lent, de pains reposés longtemps et fabriqués à base de levain pour lequel la fermentation s'est faite naturellement. Le pain au levain doit sa qualité organoleptique à son odeur, sa saveur et ses arômes (Gobbetti et al., 2014b).

Avec les techniques et avancées actuelles, nous avons pu décrire au cours de cette thèse, la diversité microbienne des levains naturels français issus d'agriculture biologique et les flux de bactéries et levures de la graine jusqu'au levain. Nous avons pu réfléchir au lien entre la diversité des microorganismes des levains et la diversité des pratiques artisanales des boulangers. Nous avons pu étudier l'effet du terroir, des variétés de blés, des levains des boulangers sur les propriétés du produit final de la chaîne, le pain. Cette recherche a été effectuée dans le cadre d'un projet de recherche participative, où les acteurs locaux, paysans, boulangers, scientifiques de multiples disciplines ont été partenaires pour construire les plans d'expériences, expérimenter, analyser les résultats, faire connaître le projet et contribuer à faire avancer le dialogue citoyen – chercheur.

Dans cette discussion, nous parlerons de la dispersion et sélection des espèces microbiennes le long de la filière, de l'origine de la flore des levains et l'impact fonctionnel de cette diversité microbienne sur la qualité des pains. Nous discuterons de la nécessité de conserver dynamiquement la diversité des levains à travers la diversité des pratiques. Enfin nous expliquerons la démarche participative de cette thèse et présenterons les perspectives de ce travail.

1. Origine de la diversité microbienne des levains

A l'aide de méthodes culture-dépendant et culture-indépendant, nous avons décrit la diversité bactérienne de 30 levains français (Chapitre III-Partie 1), la diversité des levures de 38 levains français (chapitre III – Partie II) et de levains expérimentaux après trois semaines de rafraîchis (Chapitre IV).

Dans la littérature, plus de soixante espèces de bactéries lactiques appartenant au genre *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* et *Lactobacillus* ont été décrites dans les levains de panification (De Vuyst et al., 2014a, 2017; Huys et al., 2013; Siepmann et al., 2017). En microbiologie culture-dépendante, 19 espèces de bactéries lactiques ont été décrites, de 1 à 5 espèces par levain. Malgré cette diversité importante d'espèces de bactéries, il existe une prédominance de l'espèce *Lactobacillus sanfranciscensis*. En effet cette espèce a été décrite dans un grand nombre de levain du monde (De Vuyst et al., 2017; Gobbetti et al., 2016; Siepmann et al., 2017) et en France (76% des levains français issue d'agriculture biologique, (Lhomme, 2015). L'étude du génome complet de la souche de *L. sanfranciscensis* TMW 1.1304 a contribué à démontrer la compétitivité de cette espèce. *L. sanfranciscensis* possède un nombre important d'opéron de l'ARN ribosomal avec 7 copies du gène ADNr 16S, et des gènes de synthèse d'acides aminés peu abondants dans les céréales. Son génome lui permet une croissance et mise en place du métabolisme fermentaire rapide dans l'écosystème levain (Vogel et al., 2011). La capacité de la capacité de *L. sanfranciscensis* à perdurer dans le levain semble être cependant dépendante de la souche (Lhomme et al., 2016b). Elle a été retrouvée dans la farine et les levains, mais nous ne l'avons pas trouvé sur la superficie des grains, dans la flore épiphyte. Cette espèce bactérienne proviendrait-elle des insectes, des pratiques du meunier, du moulin, des silos de stockage, des mains du boulangers ou serait-elle une bactérie endophyte des blés ?

L'origine de cette espèce dans les levains n'a pas encore été bien élucidée. Cette espèce a été trouvée dans l'air du fournil, les équipements du boulangers (mixer, table) (Minervini et al., 2015b; Scheirlinck et al., 2009). A notre connaissance, elle n'a jamais été trouvée spécifiquement comme endophyte du grain de blé. Toutefois, le genre *Lactobacillus* a été trouvé comme endophyte à de nombreux stades et dans de nombreux organes du blé dont la fleur et le grain (Alfonzo et al., 2017; Minervini et al., 2015a). L'espèce *L. plantarum* est souvent retrouvée comme endophyte et épiphyte du blé (Minervini et al., 2015a). *L. sanfranciscensis* a aussi été détecté sur le blé, mais malheureusement l'organe où elle aurait été trouvée n'est pas renseigné (Minervini et al., 2015). Il est donc possible que l'espèce *L. sanfranciscensis* soit un endophyte du grain de blé, présent à faible densité. Alternativement, *L. sanfranciscensis* pourrait provenir de la meunerie. Dans l'expérience du chapitre IV, les levains de la boulangère qui a fait la mouture contiennent l'espèce *Lactobacillus plantarum*, alors que les autres boulangers expérimentateurs ont des levains contenant l'espèce *L. sanfranciscensis*. La colonisation de la farine par *L. sanfranciscensis* ne se serait pas faite dans le moulin, mais post-

mouture lors du stockage des farines. Inversement, il est possible que *L. sanfranciscensis* ait été apporté à tous les boulangers dans la farine par l'étape de mouture mais que l'espèce *L. plantarum* ait eu un avantage sélectif et qu'elle ait gagné la compétition face à *L. sanfranciscensis* dans les levains de la boulangère meunière. Cette théorie serait étayée par le fait qu'elle a été retrouvée prédominante dans les échantillons fécaux de deux insectes. Les déjections relâchées par les insectes dans les produits céréaliers stockés pourraient être le réservoir naturel de *L. sanfranciscensis* (Boiocchi et al., 2017a).

Concernant les autres espèces retrouvées dans les levains finaux (S3) de notre expérimentation après trois semaines de rafraichi, *Lactobacillus plantarum*, *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. paralimentarius*, *L. heilongjiangensis*, *L. koreensis*, *L. brevis*, *L. spicheri*, *L. hammesii*, *L. rossiae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Pediococcus parvulus* et *Pediococcus pentosaceus* - quelles sont leurs sources et leurs vecteurs ? Des bactéries lactiques ont été retrouvées dans et sur les grains de blé (Pontonio et al., 2018). La graine pourrait ainsi représenter un réservoir potentiel pour les bactéries (Minervini et al., 2018a). La transmission pourrait alors se faire par la farine après l'écrasement du grain (De Vuyst et al., 2009; Minervini et al., 2015a). Enfin, l'eau n'est actuellement pas considérée comme réservoir de bactéries pouvant contaminer le levain (Gobbetti et al., 2016). Cependant, de futures études devraient être menées afin de s'assurer de cette hypothèse. Par ailleurs, nos résultats ne montrent pas de structuration géographique mais montrent également des espèces retrouvées seulement chez les paysans boulangers (*Lactobacillus brevis*/*L. paralimentarius*) ou seulement chez les artisans boulangers (14 espèces) qui pourraient être disséminées au cours de formations boulangères spécifiques et/ou sélectionnées par différentes pratiques boulangères.

Cela fait écho aux résultats du chapitre III partie II où les pratiques des boulangers ont un impact sur la diversité des levures. En effet, nous avons montré que des pratiques boulangères telles que le nombre de kilos de pain produits par semaine, l'origine du levain chef, l'utilisation d'une levure starter dans leur boulangerie et la température des rafraîchis pourrait avoir un impact sur la sélection de certaines espèces. Nous avons décrit 12 espèces de levures dans les levains français, dont les 3 espèces majoritaires *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania humilis* et *Kazachstania bulderi*. *Kazachstania humilis* était appelée anciennement *Candida humilis* ou *Candida milleri* (Jacques et al., 2016). Parmi ces 12 espèces, nous avons aussi décrit une nouvelle espèce du genre *Kazachstania* chez *plusieurs boulangers/paysan-boulangers*. Cette dernière n'a pas encore été nommée et est phylogénétiquement proche d'une souche

retrouvée dans un produit fermenté bulgare (Source : NCBI). *Kazachstania saulgeensis* CLIB 1764^{T} (Jacques et al., 2016; Sarilar et al., 2017) avec le numéro d'accession PRJEB20516 (NCBI) est aussi une nouvelle espèce. Elle a été isolée chez Michel Perrin, un paysan-boulanger du projet BAKERY. Cette espèce n'a été retrouvée que dans son levain à travers le monde. Actuellement, plus de 30 espèces de levures ont été décrites dans les levains panification (Carbonetto et al., 2018) et appartiennent très majoritairement à la famille de *Saccharomycetaceae*. Au cours de nos travaux, les espèces de levures qui dominent les levains après trois semaines de rafraîchis n'ont pas été retrouvées dans les grains et les farines utilisées, mais seulement dans les levains expérimentaux. La même espèce de levure domine les levains expérimentaux et les levains personnels des boulangers. Pourtant, les boulangers n'ont pas inoculé de leur levain personnel dans les levains expérimentaux. La levure dominante viendrait alors du microbiote du foyer. Les levures du levain mature pourraient alors provenir d'ingrédients supplémentaires que l'artisan choisirait de mettre : houblon, miel, fruits trop mûrs, grains de raisin, moût de raisin, sel, sucre… (Minervini et al., 2014), ou encore de vecteurs comme la drosophile présente dans le fournil (Stefanini, 2018). L'hypothèse selon laquelle le microbiote de l'environnement du boulanger et de son fournil, joue un rôle important dans l'installation de la flore a été montrée en Italie (Minervini et al., 2015). Cela a été également décrit pour le fromage ou le vin (Gobbetti et al., 2018; Irlinger et al., 2015; Quijada et al., 2018). Le microbiote du foyer comprend alors l'environnement du boulanger, le boulanger et ses pratiques. Ce microbiote du foyer semble très localisé car nos résultats ne montrent pas de structure géographique et climatique.

2. Dispersion et sélection des espèces microbiennes le long de la filière boulangerie

L'analyse des flux microbiens le long de la filière boulangerie du grain au levain et l'étude de la sélection des espèces au cours de l'élaboration des levains nous a révélé que la dispersion est différente pour les champignons et les bactéries. Même si certaines espèces de champignons sont présentes de la surface du grain au levain final, comme *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Mycosphaerella tassiana* (*Ascomycota*) et *Vishniacozyma victoriae*, *Udeniomyces pyricola*, *Itersonilia panonnica* (*Basidiomycota*), un changement important dans la flore des champignons se fait après l'initiation des levains. En effet, les champignons appartenant au phylum *Basidiomycota* sont majoritairement présents dans les grains, et les farines alors que les *Ascomycota* sont majoritaires dans les levains. Plus précisément, les OTUs trouvés principalement dans le levain appartiennent pour la plupart à l'ordre des

Saccharomycetales. Globalement, la diversité des espèces décroît de la graine au levain mature. En particulier la diversité décroît dans les levains après deux et trois semaines de rafraîchis, avec une espèce dominante de levure qui s'installe au cours du temps dans la communauté en augmentant en fréquence. La sélection d'une espèce dominante de *Saccharomycetales* au cours de l'élaboration d'un levain pourrait être expliquée par les stress biotiques et abiotiques exercés par le milieu "levain" qui excluraient les autres espèces de champignons, comme une augmentation de température ou une acidification du milieu par les bactéries lactiques, la compétition pour les ressources, ou même la production de composés toxiques

La dispersion des bactéries le long de la filière est différente. La flore bactérienne des grains est caractérisée par une très large majorité d'OTU identifiés comme *Proteobacteria,* du genre *Pantoea* et *Pseudomonas*. La flore des farines est composée majoritairement de l'espèce *Pantoea agglomerans* et d'espèces appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Massilia*, *Sphingomonas* et *Kosakonia*. L'espèce *Lactobacillus sanfranciscensis* est retrouvée pour 23 échantillons de farine sur 24 avec une abondance relative dans les échantillons de moyenne 1.2%. La flore des levains est composée majoritairement d'espèces appartenant au phylum *Firmicutes*, et au genre *Lactobacillus*. Les indices de diversité des bactéries montrent un résultat différent de celui des champignons : en moyenne, la diversité bactérienne des farines et des levains à leur initiation est plus grande que celle des autres matrices (grains, levains matures). Le microbiote de la farine serait constitué des bactéries endophytes présentes dans le grain, des bactéries présentes sur l'enveloppe si la mouture permet de conserver de l'enveloppe (autre mouture que T45), du microbiote présent sur la meule et lié aux pratiques du meunier. Le microbiote des levains au premier jour de l'initiation, qui est composé de plus d'espèce de bactérie que celui de la farine et comportant de nombreux OTUs, suggère alors fortement l'apport de bactéries par le microbiote du foyer incluant le boulanger, son fournil et ses pratiques ou l'apport de bactéries lors des conditions de stockage. La Figure 74 représente la dispersion des micro-organismes le long de la filière et confirme l'hypothèse de la venue des bactéries lactiques par les farines et le microbiote du foyer et la venue des levures par le microbiote du foyer uniquement, le microbiote du foyer étant influencé par les pratiques boulangères.

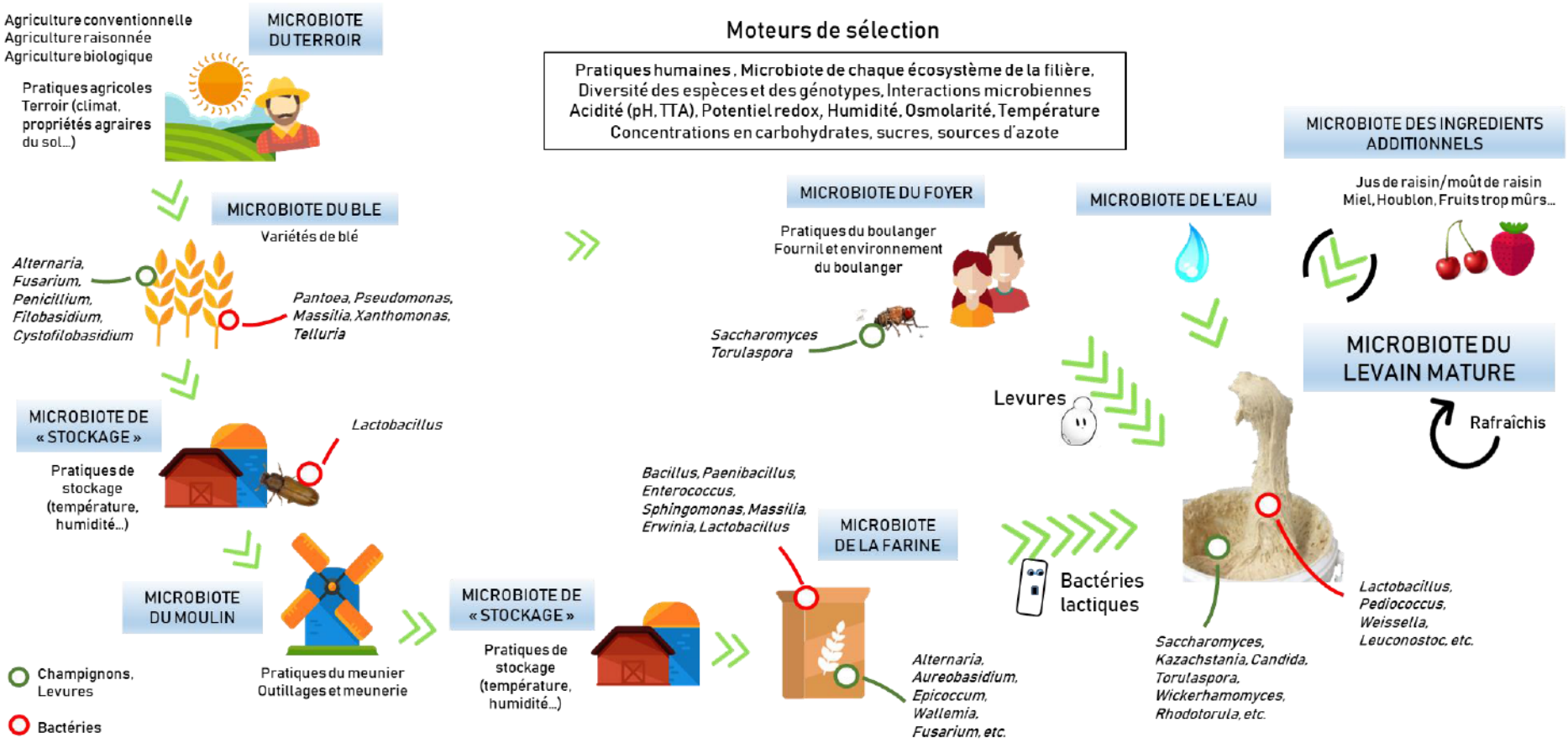


Figure 74. Représentation de la dispersion des espèces microbiennes le long de la chaîne boulangerie, afin de comprendre les hypothèses quant à l'origine de la flore des levains

3. Impact fonctionnel et déterminant de la qualité des pains

Comme vu tout au long de l'étude, le pain a une place prédominante dans notre culture et est objet de lien social dans notre société. Notre démarche expérimentale a permis d'obtenir des données sur les pains afin de caractériser de nombreuses propriétés : teneur en minéraux, composition en glucides simples, acidité globale, contenu en acides organiques, en composés volatils, caractéristiques physiques (dimensions, masse volumique, etc.). Les analyses de qualités sensorielles ont permis de relier des données fondées sur des descripteurs sensoriels des pains, aux données sur les composés volatils, la densité microbienne des levains, le microbiote du levain (origine du levain, impact du boulanger et ses pratiques), le terroir et variétés de blé.

Notre étude a permis de comprendre quelques déterminants de la qualité des pains. Nous avons détecté un effet significatif du microbiote des levains sur plusieurs propriétés des pains . Avec des levains élaborés par différents boulangers mais panifiés avec le même procédé, nous avons en effet obtenus des pains de dimensions, de couleurs et d'aspect différents. Leur contenu en sucre, en acide organique, en arômes change significativement selon l'origine des levains. La masse volumique des pains résulte d'une interaction entre le microbiote du levain et la variété de blé (dureté du grain et contenu en amidon endommagé des farines, qualité et quantité des protéines formant le réseau de gluten). Nous avons vu dans les pains issus des levains maintenus par la boulangère Lili Moyses (LM), très denses en bactéries et levures, des fermentations « complètes » des substrats glucidiques conduisant à une forte concentration en éthanol et glycérol. Nous avons également dans les pains issus des pains de la boulangère HS une faible densité de bactéries et levures, des faibles concentrations en éthanol, glycérol mais une forte concentration en glucose et un pH plus acide.

La pousse de la pâte est dépendante du volume de CO_2 produit par principalement la fermentation des levures. La pousse de la pâte dépend aussi de la force et de la structure du réseau de gluten à retenir le CO_2 produit et de la quantité de carbohydrate disponible. Les pâtes faites à partir des variétés modernes de blé semblent relâcher plus de CO_2 au cours de la panification que celles des variétés anciennes. La plus forte formation d'amidons endommagés au cours de la mouture dans les variétés modernes, conduit à plus d'hydrates de carbone disponibles ensuite pour les micro-organismes mais le CO2 produit en plus grande quantité semble majoritairement relâché.

Les minéraux des pains semblent surtout être influencés par les blés, les variétés et leur terroir. Le terroir a un effet significatif sur les concentrations des pains en phosphore, zinc, calcium, cuivre, potassium et sodium. Les variétés de blés ont un effet significatif sur les concentrations de pains en fer, zinc, calcium, cuivre, potassium et sodium. Les pains fabriqués à partir de variétés modernes contenaient plus de potassium et calcium et moins de cuivre. Le teneur en minéraux dans les pains résulterait de la concentration initiale de ce composé dans le sol, des pratiques agricoles et des fertilisants utilisés, la concentration propre à chaque variété de blé et le type de mouture utilisé sur le grain.

Les composés volatils aromatiques, présents dans la plante, produits lors de la fermentation ou pendant la réaction de Maillard durant la cuisson, contribuent à la qualité sensorielle globale des pains. Leur production semble surtout dépendre des facteurs terroir et levains. La perception des pains par les consommateurs semble également associée à la composition des pains en sucres résiduels et en acides organiques. En effet, les résultats du jury d'analyse sensorielle montrent que les pains avec un goût beurré, brioché, céréaliers, caramel contiendraient significativement plus de glucose, fructose, maltose. Les pains typés comme acides, fruités, aromatiques contiendraient, quant à eux, plus d'éthanol et de glycérol. Les pains avec un goût malté, torréfié et longs en bouche présentent des teneurs plus élevées en acétate et en succinate. Ces différentes données sont impactées soit par le terroir, la variété de blé, la flore des levains et des boulangers.

4. Une conservation dynamique de la diversité des levains à travers la diversité des pratiques

Le développement d'une filière durable en boulangerie passe par le maintien d'une diversité de pratiques, une diversité socio-culturelle adaptées aux matières premières locales, à la diminution des intrants et à la demande des consommateurs. Les levains de panification et les pains au levain représentent alors un atout pour ce développement (Ramsayer and Sicard, 2015). A notre connaissance, ce projet est le seul projet de recherche essayant de lier diversité microbienne et diversité des pratiques. Cette thèse a montré que la diversité socio-culturelle artisanale assurait le maintien de la biodiversité et vice-versa.

La France est représentée par une grande diversité de pratiques boulangères. Parmi les boulangers, on distingue les artisans boulangers inscrits à la chambre des métiers, les paysans boulangers qui sont inscrits ou non à la chambre des métiers, les boulangeries industrielles. Sur 33000 artisans (Confédération Nationale des Artisans), il est difficile d'avoir une estimation exacte du nombre de paysans-boulangers. Leur nombre est en forte croissance. La pratique de

ces boulangers reste cependant très peu mécanisée et ont une production hebdomadaire ou mensuelle modeste. Ils vendent notamment du pain à la ferme, en AMAP (Aide pour le Maintien de l'Agriculture Paysanne), dans les circuits locaux courts. Ces boulangers diffèrent principalement dans leur façon de procéder pendant la panification et dans la fréquence des panifications. Ils se différencient aussi principalement par leurs consommateurs. Actuellement, il semble nécessaire de proposer une diversité de pratiques et de goût pour répondre aux besoins de la diversité des consommateurs. Les consommateurs achetant dans des boulangeries artisanales, en circuit court cherchent à donner du sens à leur achat. En effet, nous avons vu dans l'étude en collaboration avec des psycho-sociologues que le rapport au pain au levain est inscrit dans la modernité alimentaire, dans le processus de réappropriation de l'alimentation et une volonté de souveraineté alimentaire. Il est lié à une action citoyenne et une dimension éthique, environnementale, sociétale quand l'achat et la consommation de pain est pensé. Les profils aromatiques des pains changeant avec le terroir des blés et le terroir du levain, le développement de filière locale pourrait donc promouvoir une diversité des goûts. Mes travaux ont donc montré tout l'intérêt d'un programme de conservation des pratiques artisanales diversifiées pour maintenir une diversité microbienne, des semences, afin de proposer une offre diversifiée de pains et maintenir une boulangerie artisanale ou paysanne durable. Finalement, l'efficacité de systèmes alternatifs de formation et de transfert des savoirs pourrait contribuer à augmenter la résilience des boulangers et des écosystèmes.

5. La démarche participative

Ce projet est une première d'une recherche participative multidisciplinaire à grande échelle autour de la microbiologie. La recherche participative, comme mode de production des savoirs permet la démocratisation de la science. Ce projet a proposé un échange, une co-construction entre savoirs paysans, locaux et savoirs scientifiques. L'objectif a été de produire des connaissances qui, à la fois, constituaient un réel intérêt scientifique pour les scientifiques et répondant également aux besoins des boulangers (sciencescitoyennes.org). En effet, les recherches participatives reconnaissent et incluent des savoirs issus des participants, savoirs expérientiels, connaissances tacites, traditions, astuces, etc. (Lechopier, 2013). Un projet américain plus récent est en cours (http://robdunnlab.com/projects/sourdough/) et récolte des levains dans le monde entier pour analyser la flore microbienne. Cependant, ils demandent aux citoyens de fournir des levains, mais ces citoyens ne sont ni au cœur de la construction du projet ni de l'analyse des résultats, ni dans la diffusion. Il s'agit alors de science participative où les

savoirs sont acquis grâce aux citoyens mais pas de recherche participative où les questions, expérimentations et résultats sont coconstruits autour des savoir de tous.

La recherche participative est une démarche passionnante soulevant de nombreuses questions. Cependant, cette démarche n'est pas facile. Au cours de cette étude, nous avons eu par exemple des difficultés à recueillir et s'approprier les savoir-faire boulangers, notamment sur les pratiques boulangères (Chapitre III, Partie II). Nous nous sommes heurtés à la complexité de la multidisciplinarité et nous avons dû apprendre à communiquer avec un vocabulaire commun. Un glossaire a alors été construit (Chapitre VII) pour favoriser le dialogue et l'échange scientifique – boulangers et plusieurs rencontres chercheurs-boulangers ont été organisées.

A terme, la recherche participative est une solution au problème de l'appropriation et de l'usage des connaissances scientifiques. La restitution des résultats est un passage obligatoire et fait partie des activités de recherche. En effet, la déontologie scientifique exige de rendre publique les connaissances, souvent par le biais de journaux scientifiques, mais aussi par la communication vers les décideurs et le public (Lechopier, 2013). De plus, il existe une sorte de contrat moral : on peut considérer que c'est un juste retour des choses que les personnes qui ont contribué à réaliser une recherche se voient informées des connaissances qu'elles ont contribué à produire (Lechopier, 2013).

Perspectives de ce travail de thèse

Cette thèse offre plusieurs perspectives de recherche. La construction de la suite du projet BAKERY est en cours afin de continuer à décrypter les effets des variétés, des pratiques agricoles et des procédés de panification sur la diversité microbienne et les caractéristiques des pains. Des échantillons de farines, de pâtes, de pains sont en cours d'analyse pour comprendre l'évolution des protéines du gluten au cours de la panification en collaboration avec l'UMR IATE. Ces travaux reposent sur les levains et panifications expérimentales de ma thèse et permettront de tester l'effet du terroir, des variétés et des levains sur les fractions de protéines solubles et insolubles des pains. Un article de valorisation sera publié dont je serai co-auteur. Ce projet sera complété par un projet en cours en Occitanie, appelé « Gluten: mythe ou réalité ? » qui vise à comparer l'effet des pratiques artisanales et industrielles sur les fractions protéiques des pains et à étudier les représentations des consommateurs hypersensibles au gluten. Des panifications à la levure et au levain seront réalisées pour étudier l'impact de ces

types de fermentation sur le gluten. Par ailleurs, les résultats de METABAR-FOOD sont en cours d'analyses afin de valider une méthode d'analyses de métabarcoding des micro-eucaryotes dans des produits alimentaires qui aboutira à la publication d'un article scientifique dont je serai aussi co-auteur. Enfin, la collaboration avec les psycho-sociologues sur les représentations sociales du pain, du levain, des pratiques fera l'objet d'une valorisation. Elles présentent un lien entre représentations du levain et pratiques boulangères et un lien entre représentations du levain et pratiques de don, d'échange et/ou de mélange des levains entre professionnels contribuant à la circulation territoriale d'une biodiversité amplifiée par rapport au domaine de la boulangerie conventionnelle. Il est prévu une diffusion du glossaire et du chapitre V de vulgarisation. Nous prévoyons enfin de transmettre les résultats à d'autres boulangers par le réseau Semences Paysannes, des écoles de boulangeries, CFPPA, des livres et aux citoyens à travers des rencontres, des évènements, un blog, etc.

Liste des communications

Communications scientifiques orales internationales

Elisa Michel, Héloise Debroise, Marion Deffrasnes, Isabelle Hue, Stéphane Guezenec, Julien Lebrat, Judith Legrand, Isabelle Goldringer, Simon Rousselot, Véronique Chable, Estelle Serpolay-Besson, Camille Vindras, Bruno Taupier-Letage, Marie-Noëlle Madec, Florence Valence, Philippe Roussel, Serge Casaregola, Laurent Marteau, Florent Mercier, Gilles Simonneaux, Lycée Agricole du Rheu, Michel Perrin, Xavier Dell'armi, Emilien Brochet, Hélène Simon, Benjamin Pelletier, Adrien Pelletier, Lili Moyses, Xavier Dousset, Bernard Onno, Delphine Sicard and 34 other bakers. 2017. **Impact of baker's practices, terroir and wheat varieties on sourdough microbial taxonomic and functional diversity**. 4th International Conference on Microbial Diversity - MD 2017, Bari, Italie

Elisa Michel, Héloise Debroise, Julien Lebrat, Marion Deffrasnes, Isabelle Hue, Stéphane Guezenec, Judith Legrand, Isabelle Goldringer, Simon Rousselot, Véronique Chable, Estelle Serpolay-Besson, Matthieu Barret, Marie-Noëlle Madec, Florence Valence, Philippe Roussel, Serge Casaregola, Laurent Marteau, Florent Mercier, Gilles Simonneaux, Lycée Agricole du Rheu, Michel Perrin, Xavier Dell'armi, Emilien Brochet, Hélène Simon, Lili Moyses, Xavier Dousset, Bernard Onno, Delphine Sicard and 26 other bakers. 2018. **Role of agronomic and bread-making practices in sourdough microbial diversity and bread nutritional and organoleptic properties**. 7th International Sourdough Symposium – Cork, Irlande

Communications scientifiques orales françaises

Elisa Michel, Emilie Lhomme, Charlotte Urien, Isabelle Hue, Clarisse Montfort, Stéphane Guezenec, Yoann Robert, Candice Aulard, Josette Bessière, Judith Legrand, Isabelle Goldringer, Matthieu Barret, Marie-Noëlle Madec, Florence Valence, Noémie Jacques, Véronique Sarilar, Colin R. Tinsley, Serge Casaregola, Xavier Dousset, Bernard Onno, Delphine Sicard and 38 bakers. 2016. **Le levain, un microbiote riche de diversité**. Colloque « Pain au levain, entre tradition et modernité », Paris, France

Elisa Michel, Thibault Nidelet, Belen Carbonetto, Lucie Farrera, Jean-Luc Legras, Yoann Robert, Jean-Nicolas Jasmin, Sylvie Dequin, Kate Howell, Delphine Sicard. 2017. **Ecology and evolution of yeasts in wine and bread ecosystems**. Microbioccitanie, Toulouse, France

Posters scientifiques

Elisa Michel, Maria Bernard, Olivier Bouchez, Serge Casaregola, Monika Coton, Céline Delbes, Hugo Devillers, Eric Dugat-Bony, Stéphane Guezenec, Kate Howell, Françoise Irlinger, Jean-Luc Legras, Valentin Loux, Cécile Neuvéglise, Thibault Nidelet, Mahendra Mariadassou, Jérôme Mounier, Géraldine Pascal, Pierre Renault, Olivier Rué, Sébastien Terrat, Monique Zagorec, Delphine Sicard. 2017. **METABAR-FOOD: Metabarcoding and shot-gun of food microbiota**. MEM's days, Paris, France

Elisa Michel, Emilie Lhomme, Charlotte Urien, Héloise Debroise, Marion Deffrasnes, Isabelle Hue, Clarisse Montfort, Stéphane Guezenec, Yoann Robert, Candice Aulard, Josette Bessière,

Judith Legrand, Isabelle Goldringer, Simon Rousselot, Véronique Chable, Estelle Serpolay-Besson, Matthieu Barret, Marie-Noëlle Madec, Florence Valence, Philippe Roussel, Noémie Jacques, Véronique Sarilar, Colin R. Tinsley, Serge Casaregola, Laurent Marteau, Florent Mercier, Gilles Simonneaux, Lycée Agricole du Rheu, Michel Perrin, Xavier Dell'armi, Emilien Brochet, Hélène Simon, Lili Moyses, Xavier Dousset, Bernard Onno, Delphine Sicard and 26 other bakers . 2017. **Terroir, baker's practices, wheat varietes and their influence on sourdough microbial diversity**. MEM's days, Paris, France

Communications vulgarisées orales et écrites

Elisa Michel, Clarisse Montfort, Marion Deffrasnes, Emilie Lhomme, Matthieu Barret, Marie-Noëlle Madec, Florence Valence, Delphine Sicard, Xavier Dousset, Bernard Onno et 30 boulangers. 2016. **Diversité des bactéries lactiques dans les levains naturels français**. Journées ANR Bakery, Gif-sur-Yvette, France

Elisa Michel, Charlotte Urien, Judith Legrand, Noémie Jacques, Véronique Sarilar, Colin R. Tinsley, Serge Casaregola, Yoann Robert, Josette Bessière, Candice Aulard, Stéphane Guézenec, Delphine Sicard et 30 boulangers. 2016. **Diversité des espèces de levures dans les levains naturels français**. Journées ANR Bakery, Gif-sur-Yvette, France

Elisa Michel, Emilie Lhomme, Charlotte Urien, Judith Legrand, Clarisse Montfort, Marion Deffrasnes, Stéphane Guézenec, Xavier Dousset, Delphine Sicard, Bernard Onno et 30 boulangers. 2016. **Analyses Physico-chimiques et microbiologistes de 30 levains naturels et pains français**. Journées ANR Bakery, Gif-sur-Yvette, France

Amandine Deroite, Elisa Michel, Delphine Sicard, Sandrine Mallet. 2016. **Les micro-organismes : définition, diversité et rôle dans notre alimentation**. Terres d'octobre, Prades-le-Lez, France

Amandine Deroite, Elisa Michel, Delphine Sicard, Sandrine Mallet. 2016. **Diversité des terroirs, des blés, des levures, des bactéries, des pratiques boulangères : quel impact sur la saveur et qualité nutritionnelle du pain ?** Terres d'octobre, Prades-le-Lez, France

Elisa Michel, Delphine Sicard. 2016**. Diversité des ferments, des blés, des farines de blé tendre en panification**. Blé dur un jour, blé dur toujours, SupAgro, Montpellier, France

UMR Sciences pour l'oenologie, équipe Microbiologie. 2017. Les micro-organismes: diversité et rôle dans le pain et le vin; Diversité des levures de l'espèce Saccharomyces cerevisiae dans les produits fermentés; Suivi automatique de la cinétique fermentaire; Suivi automatique de la production des arômes fermentaires. Salon International de l'Agriculture, Paris, France

Elisa Michel, Delphine Sicard e Estelle Serpolay. 2017. **Importanza dei micro-organismi nel sistema alimentare. Coltiviamo la diversità !** Peccioli, Italie

Elisa Michel, Héloise Debroise, Marion Deffrasnes, Isabelle Hue, Stéphane Guezenec, Julien Lebrat, Judith Legrand, Isabelle Goldringer, Simon Rousselot, Véronique Chable, Estelle Serpolay-Besson, Camille Vindras, Bruno Taupier-Letage, Marie-Noëlle Madec, Florence

Valence, Philippe Roussel, Serge Casaregola, Laurent Marteau, Florent Mercier, Gilles Simonneaux, Lycée Agricole du Rheu, Michel Perrin, Xavier Dell'armi, Emilien Brochet, Hélène Simon, Benjamin Pelletier, Adrien Pelletier, Lili Moyses, Xavier Dousset, Bernard Onno, Delphine Sicard and 34 other bakers. 2017. **La diversité des levains français**. Journée professionnelle Blés Paysans Bio GABB 49, La Biodiversité cultivée du champ à l'assiette, Angers, France

Elisa Michel, Camille Vindras, Delphine Sicard. 2017. « BAKERY » : **Diversité et interactions dans un écosystème agro-alimentaire « Blé/Homme/Levain » à faible intrant : vers une meilleure compréhension de la durabilité de la filière boulangerie**. Let's liberate diversity, Virton, Belgique

Elisa Michel, Florent Mercier, Lili Moyses, Michel Perrin, Hélène Simon, Xavier Dell'armi, Bernard Onno, Camille Vindras, Delphine Sicard. 2018. **Impact des factors agri-agro et boulange sur les levains et le pain**. Journées ANR Bakery, Tournus, France.

Vidéo : Biodiversité des levains pour des pains de qualité www.inra.fr/Entreprises-Monde-agricole/Resultats-innovation-transfert/Tous-les-magazines/Projet-Bakery

Publications

Elisa Michel, Clarisse Monfort, Marion Deffrasnes, Stéphane Guezenec, Emilie Lhomme, Matthieu Barret, Delphine Sicard, Xavier Dousset, Bernard Onno. 2016. **Characterization of relative abundance of Lactic Acid Bacteria species in French organic sourdough by cultural, qPCR and MiSeq high-throughput sequencing methods.** International Journal of Food Microbiology https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.034

Références

Addinsoft, T.M. (2007). XlSTAT Your data analysis solution (Versión).

Alexandre, H., Costello, P.J., Remize, F., Guzzo, J., and Guilloux-Benatier, M. (2004). Saccharomyces cerevisiae–Oenococcus oeni interactions in wine: current knowledge and perspectives. International Journal of Food Microbiology *93*, 141–154.

Alfonzo, A., Urso, V., Corona, O., Francesca, N., Amato, G., Settanni, L., and Di Miceli, G. (2016). Development of a method for the direct fermentation of semolina by selected sourdough lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology *239*, 65–78.

Alfonzo, A., Miceli, C., Nasca, A., Franciosi, E., Ventimiglia, G., Di Gerlando, R., Tuohy, K., Francesca, N., Moschetti, G., and Settanni, L. (2017). Monitoring of wheat lactic acid bacteria from the field until the first step of dough fermentation. Food Microbiology *62*, 256–269.

Al-Jassaci, M.J., Mohammed, G.J., and Hameed, I.H. (2016). Secondary Metabolites Analysis of Saccharomyces cerievisiae and Evaluation of Antibacterial Activity. International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research *8*, 304–315.

Almeida, P., Barbosa, R., Zalar, P., Imanishi, Y., Shimizu, K., Turchetti, B., Legras, J.-L., Serra, M., Dequin, S., and Couloux, A. (2015). A population genomics insight into the Mediterranean origins of wine yeast domestication. Molecular Ecology *24*, 5412–5427.

Alonso, N., Antolín, F., Burjarchs, F., Fortó, A., MAese, X., MensuA, C., Piqué, R., VidAl, À., and Yll, R. (2010). Food and fuel. Strategies of production and consumption from antiquity to the Middle Age in Camp Vermell (Sant Julià de Lòria, Andorra). Des Hommes et Des Plantes. Exploitation Du Milieu et Gestion Des Ressources Végétales de La Préhistoire à Nos Jours (XXXe Rencontres Internationales d'Archéologie et d'Histoire d'Antibes). Nice 291–315.

Amari, M., Laguerre, S., Vuillemin, M., Robert, H., Loux, V., Klopp, C., Morel, S., Gabriel, B., Remaud-Siméon, M., Gabriel, V., et al. (2012). Genome Sequence of Weissella confusa LBAE C39-2, Isolated from a Wheat Sourdough. J. Bacteriol. *194*, 1608–1609.

Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S., and Chevallier, I. (2005). Characterization and selection of Lactobacillus sakei strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. Food Microbiology *22*, 529–538.

Appels, R., Eversole, K., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., Stein, N., Pozniak, C.J., Choulet, F., Distelfeld, A., and Poland, J. (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. Science *361*, eaar7191.

Arranz-Otaegui, A., Carretero, L.G., Ramsey, M.N., Fuller, D.Q., and Richter, T. (2018). Archaeobotanical evidence reveals the origins of bread 14,400 years ago in northeastern Jordan. Proceedings of the National Academy of Sciences 201801071.

Arroyo-López, F.N., Medina, E., Ruiz-Bellido, M.Á., Romero-Gil, V., Montes-Borrego, M., and Landa, B.B. (2016). Enhancement of the knowledge on fungal communities in directly brined Aloreña de Málaga green olive fermentations by metabarcoding analysis. PloS One *11*, e0163135.

Astier, M. (2016). Quel pain voulons-nous? (Le Seuil).

Banu, I., Vasilean, I., and Aprodu, I. (2011). Effect of select parameters of the sourdough rye fermentation on the activity of some mixed starter cultures. Food Biotechnology *25*, 275–291.

Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Préveaux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P., and Jacques, M.-A. (2015a). Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota. Appl. Environ. Microbiol. *81*, 1257–1266.

Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Préveaux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P., and Jacques, M.-A. (2015b). Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota. Applied and Environmental Microbiology *81*, 1257–1266.

Battcock, M. (1998). Fermented fruits and vegetables: a global perspective (Food & Agriculture Org.).

Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., De Wit, P., Sánchez-García, M., Ebersberger, I., and de Sousa, F. (2013). Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. Methods in Ecology and Evolution *4*, 914–919.

Berg, G., and Raaijmakers, J.M. (2018). Saving seed microbiomes. The ISME Journal *12*, 1167–1170.

Berghofer, L.K., Hocking, A.D., Miskelly, D., and Jansson, E. (2003). Microbiology of wheat and flour milling in Australia. International Journal of Food Microbiology *85*, 137–149.

Bessmeltseva, M., Viiard, E., Simm, J., Paalme, T., and Sarand, I. (2014). Evolution of bacterial consortia in spontaneously started rye sourdoughs during two months of daily propagation. PloS One *9*, e95449.

Boiocchi, F., Porcellato, D., Limonta, L., Picozzi, C., Vigentini, I., Locatelli, D.P., and Foschino, R. (2017a). Insect frass in stored cereal products as a potential source of Lactobacillus sanfranciscensis for sourdough ecosystem. Journal of Applied Microbiology *123*, 944–955.

Boiocchi, F., Porcellato, D., Limonta, L., Picozzi, C., Vigentini, I., Locatelli, D.P., and Foschino, R. (2017b). Insect frass in stored cereal products as a potential source of Lactobacillus sanfranciscensis for sourdough ecosystem. Journal of Applied Microbiology *123*, 944–955.

Bokulich, N.A., and Mills, D.A. (2013). House microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. Applied and Environmental Microbiology AEM–00934.

Bonanomi, G., De Filippis, F., Cesarano, G., La Storia, A., Ercolini, D., and Scala, F. (2016). Organic farming induces changes in soil microbiota that affect agro-ecosystem functions. Soil Biology and Biochemistry *103*, 327–336.

Bonnin, I., Bonneuil, C., Goffaux, R., Montalent, P., and Goldringer, I. (2014). Explaining the decrease in the genetic diversity of wheat in France over the 20th century. Agriculture, Ecosystems & Environment *195*, 183–192.

Bonnot, T. (2016). Réponse du grain de blé à la nutrition azotée et soufrée: étude intégrative des mécanismes moléculaires mis en jeu au cours du développement du grain par des analyses-omiques. PhD Thesis. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.

Boynton, P.J., and Greig, D. (2014). The ecology and evolution of non-domesticated Saccharomyces species. Yeast *31*, 449–462.

Braidwood, R.J., Sauer, J.D., Helbaek, H., Mangelsdorf, P.C., Cutler, H.C., Coon, C.S., Linton, R., Steward, J., and Oppenheim, A.L. (1953). Symposium: did man once live by beer alone? American Anthropologist *55*, 515–526.

Brilhante, R.S.N., de Alencar, L.P., de Aguiar Cordeiro, R., Castelo, D. de S.C.M., Teixeira, C.E.C., de Brito Macedo, R., Lima, D.T., Paiva, M. de A.N., Monteiro, A.J., and Alves, N.D. (2013). Detection of Candida species resistant to azoles in the microbiota of rheas (Rhea americana): possible implications for human and animal health. Journal of Medical Microbiology *62*, 889–895.

Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S., and Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. New Phytologist *184*, 449–456.

Bui, T.P.N., Kim, Y.-J., In, J.-G., and Yang, D.-C. (2011). Lactobacillus koreensis sp. nov., isolated from the traditional Korean food kimchi. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology *61*, 772–776.

Calvel, R. (1981). Fermentation et panification au levain naturel. Ind. Cereales *5*, 31–36.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., and Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 4516–4522.

Carbonetto, B., Ramsayer, J., Nidelet, T., Legrand, J., and Sicard, D. (2018). Bakery yeasts, a new model for studies in ecology and evolution. Yeast.

Carretero, L.G., Wollstonecroft, M., and Fuller, D.Q. (2017). A methodological approach to the study of archaeological cereal meals: a case study at Çatalhöyük East (Turkey). Veget Hist Archaeobot *26*, 415–432.

Carrigan, M.A., Uryasev, O., Frye, C.B., Eckman, B.L., Myers, C.R., Hurley, T.D., and Benner, S.A. (2015). Hominids adapted to metabolize ethanol long before human-directed fermentation. Proceedings of the National Academy of Sciences *112*, 458–463.

Carter, H., and Mace, A.C. (2012). The Discovery of the Tomb of Tutankhamen (Courier Corporation).

Clément, H., Prost, C., Chiron, H., Ducasse, M.B., Della Valle, G., Courcoux, P., and Onno, B. (2018a). The effect of organic wheat flour by-products on sourdough performances assessed by a multi-criteria approach. Food Research International *106*, 974–981.

Clément, H., Prost, C., Chiron, H., Ducasse, M.B., Della Valle, G., Courcoux, P., and Onno, B. (2018b). The effect of organic wheat flour by-products on sourdough performances assessed by a multi-criteria approach. Food Research International *106*, 974–981.

Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., and Rantsiou, K. (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. International Journal of Food Microbiology *167*, 29–43.

Coda, R., Kianjam, M., Pontonio, E., Verni, M., Di Cagno, R., Katina, K., Rizzello, C.G., and Gobbetti, M. (2017). Sourdough-type propagation of faba bean flour: Dynamics of microbial consortia and biochemical implications. International Journal of Food Microbiology *248*, 10–21.

Cole, J.R., Wang, Q., Chai, B., and Tiedje, J.M. (2011). The Ribosomal Database Project: Sequences and Software for High-Throughput rRNA Analysis. Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches 313–324.

Core, U.D.B. (2015). Sickle: A windowed adaptive trimming tool for FASTQ files using quality. UC Davis, California, United States of America. URL: Http://Bioinformatics. Ucdavis. Edu/Software/(Accessed: 7 September 2015).

Cornwall, A., and Jewkes, R. (1995). What is participatory research? Social Science & Medicine *41*, 1667–1676.

Corsetti, A. (2013). Technology of sourdough fermentation and sourdough applications. In Handbook on Sourdough Biotechnology, (Springer), pp. 85–103.

Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., and Gobbetti, M. (2001). Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species Triticum durum and Triticum aestivum) sourdoughs of Southern Italy. International Journal of Food Microbiology *64*, 95–104.

Corsetti, A., Angelis, M.D., Dellaglio, F., Paparella, A., Fox, P.F., Settanni, L., and Gobbetti, M. (2003). Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses. Journal of Applied Microbiology *94*, 641–654.

Corsetti, A., Settanni, L., Chaves López, C., Felis, G.E., Mastrangelo, M., and Suzzi, G. (2007). A taxonomic survey of lactic acid bacteria isolated from wheat (Triticum durum) kernels and non-conventional flours. Systematic and Applied Microbiology *30*, 561–571.

Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloumme-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., and Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. FEMS Microbiology Ecology *93*.

Crowley, S., Mahony, J., and van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. Trends in Food Science & Technology *33*, 93–109.

Curry, A. (2013). The milk revolution. Nature *500*, 20.

Darby, W.J., Ghalioungui, P., and Grivetti, L. (1977). Food: the gift of Osiris. Volumes 1 and 2. Food: The Gift of Osiris. Volumes 1 and 2.

Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., and Piškur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? FEMS Yeast Research *14*, 826–832.

De Angelis, M., Calasso, M., Cavallo, N., Di Cagno, R., and Gobbetti, M. (2016). Functional proteomics within the genus Lactobacillus. Proteomics *16*, 946–962.

De Souza, R.S.C., Okura, V.K., Armanhi, J.S.L., Jorrín, B., Lozano, N., Da Silva, M.J., González-Guerrero, M., De Araújo, L.M., Verza, N.C., and Bagheri, H.C. (2016). Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. Scientific Reports *6*, 28774.

De Vuyst, L., and Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. Trends in Food Science & Technology *16*, 43–56.

De Vuyst, L., and Vancanneyt, M. (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. Food Microbiology *24*, 120–127.

De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., and Weckx, S. (2009). Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. Food Microbiology *26*, 666–675.

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.-M., and Weckx, S. (2014a). Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? Food Microbiology *37*, 11–29.

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.-M., and Weckx, S. (2014b). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? Food Microbiology *37*, 11–29.

De Vuyst, L., Harth, H., Van Kerrebroeck, S., and Leroy, F. (2016). Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. International Journal of Food Microbiology *239*, 26–34.

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., and Leroy, F. (2017). Microbial Ecology and Process Technology of Sourdough Fermentation. Advances in Applied Microbiology.

Decimo, M., Quattrini, M., Ricci, G., Fortina, M.G., Brasca, M., Silvetti, T., Manini, F., Erba, D., Criscuoli, F., and Casiraghi, M.C. (2017). Evaluation of microbial consortia and chemical changes in spontaneous maize bran fermentation. AMB Express *7*, 205.

Dehlholm, C., Brockhoff, P.B., Meinert, L., Aaslyng, M.D., and Bredie, W.L. (2012). Rapid descriptive sensory methods–comparison of free multiple sorting, partial napping, napping, flash profiling and conventional profiling. Food Quality and Preference *26*, 267–277.

Demeulenaere, É., Rivière, P., Hyacinthe, A., Baltassat, R., Baltazar, S., Gascuel, J.-S., Lacanette, J., Montaz, H., Pin, S., and Ranke, O. (2017). La sélection participative à l'épreuve du changement d'échelle. À propos d'une collaboration entre paysans sélectionneurs et généticiens de terrain. Natures Sciences Sociétés *25*, 336–346.

Dertli, E., Skory, C.D., and Şimşek, Ö. (2018). Genome Sequences of Five Lactobacillus sp. Isolates from Traditional Turkish Sourdough. Genome Announc. *6*, e00616-18.

DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., and Andersen, G.L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Applied and Environmental Microbiology *72*, 5069–5072.

Desiye, A., and Abegaz, K. (2013). Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria and yeast involved in fermentation of teff (Eragrostis tef) batter. Adv. Res. Biol. Sci *1*, 36–44.

Devaux, M.-F., Réguerre, A.-L., Chiron, H., and Lassoued, N. (2005). Caractérisation par analyse d'images de produits céréaliers alvéolaires selon leur texture visuelle. Cah. Tech. INRA *56*, 17–32.

Devulder, G., Perrière, G., Baty, F., and Flandrois, J.P. (2003). BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. J. Clin. Microbiol. *41*, 1785–1787.

Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. Nature *418*, 700.

Doebley, J.F., Gaut, B.S., and Smith, B.D. (2006). The molecular genetics of crop domestication. Cell *127*, 1309–1321.

Dominy, N.J. (2015). Ferment in the family tree. Proceedings of the National Academy of Sciences *112*, 308–309.

Douglas, G.L., and Klaenhammer, T.R. (2010). Genomic evolution of domesticated microorganisms. Annual Review of Food Science and Technology *1*, 397–414.

Duar, R.M., Lin, X.B., Zheng, J., Martino, M.E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M.E., Leulier, F., Gänzle, M., and Walter, J. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus Lactobacillus. FEMS Microbiol Rev *41*, S27–S48.

Dubcovsky, J., and Dvorak, J. (2007). Genome Plasticity a Key Factor in the Success of Polyploid Wheat Under Domestication. Science *316*, 1862–1866.

Dupont, J., Dequin, S., Giraud, T., Le Tacon, F., Marsit, S., Ropars, J., Richard, F., and Selosse, M.-A. (2016). Fungi as a Source of Food. Spectrum *5*.

Dzialo, M.C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B., and Verstrepen, K.J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. FEMS Microbiology Reviews *41*, S95–S128.

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics *27*, 2194–2200.

Ehrmann, M.A., and Vogel, R.F. (1998). Maltose metabolism of Lactobacillus sanfranciscensis: cloning and heterologous expression of the key enzymes, maltose phosphorylase and phosphoglucomutase. FEMS Microbiology Letters *169*, 81–86.

Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R., and Morelli, L. (2000). Iron requirement of Lactobacillus spp. in completely chemically defined growth media. Journal of Applied Microbiology *88*, 695–703.

Ercolini, D. (2013). High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology. Appl. Environ. Microbiol. *79*, 3148–3155.

Ercolini, D., Pontonio, E., De Filippis, F., Minervini, F., La Storia, A., Gobbetti, M., and Di Cagno, R. (2013). Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. Applied and Environmental Microbiology *79*, 7827–7836.

Escudie, F., Auer, L., Bernard, M., Cauquil, L., Vidal, K., MAMAN, S., Mariadassou, M., HERNANDEZ-RAQUET, G., and Pascal, G. (2015). Find Rapidly OTU with Galaxy Solution. In JOBIM 2015-Journées Ouvertes Biologie Informatique Mathématiques, p. np.

Feillet, P. (2000). Le grain de blé: composition et utilisation (Editions Quae).

Ferchichi, M., Valcheva, R., Prévost, H., Onno, B., and Dousset, X. (2007). Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. Food Microbiology *24*, 678–686.

Filippis, F.D., Laiola, M., Blaiotta, G., and Ercolini, D. (2017). Different amplicon targets for sequencing-based studies of fungal diversity. Appl. Environ. Microbiol. AEM.00905-17.

Foschino, R., Arrigoni, C., Mora, D., Galli, A., and others (2001). Phenotypic and genotypic aspects of Lactobacillus sanfranciscensis strains isolated from sourdoughs in Italy. Food Microbiology *18*, 277–285.

Foschino, R., Gallina, S., Andrighetto, C., Rossetti, L., and Galli, A. (2004). Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. FEMS Yeast Research *4*, 609–618.

Francesca, N., Canale, D.E., Settanni, L., and Moschetti, G. (2012). Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds. Environmental Microbiology Reports *4*, 105–112.

Franco, W., and Pérez-Díaz, I.M. (2013). Microbial interactions associated with secondary cucumber fermentation. Journal of Applied Microbiology *114*, 161–172.

Frankel, R. (2003). The Olynthus Mill, Its Origin, and Diffusion: Typology and Distribution. American Journal of Archaeology *107*, 1–21.

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

GABRIEL, V., Lefebvre, D., Vayssier, Y., and Faucher, C. (1999). Characterization of the microflora from natural sourdoughs. MAN Microbiologie, Aliments, Nutrition *17*, 171–179.

Gallone, B., Mertens, S., Gordon, J.L., Maere, S., Verstrepen, K.J., and Steensels, J. (2018). Origins, evolution, domestication and diversity of Saccharomyces beer yeasts. Current Opinion in Biotechnology *49*, 148–155.

Gänzle, M.G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. Current Opinion in Food Science *2*, 106–117.

Gänzle, M.G., and Zheng, J. (2018). Lifestyles of sourdough lactobacilli – Do they matter for microbial ecology and bread quality? International Journal of Food Microbiology.

Gänzle, M.G., Ehmann, M., and Hammes, W.P. (1998). Modeling of growth of Lactobacillus sanfranciscensis and Candida milleri in response to process parameters of sourdough fermentation. Applied and Environmental Microbiology *64*, 2616–2623.

Gänzle, M.G., Vermeulen, N., and Vogel, R.F. (2007). Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. Food Microbiology *24*, 128–138.

Garofalo, C., Silvestri, G., Aquilanti, L., and Clementi, F. (2008). PCR-DGGE analysis of lactic acid bacteria and yeast dynamics during the production processes of three varieties of Panettone. Journal of Applied Microbiology *105*, 243–254.

Gatto, V., and Torriani, S. (2004). Microbial population changes during sourdough fermentation monitored by DGGE analysis of 16S and 26S rRNA gene fragments. Annals of Microbiology *54*, 31–42.

Gerbault, P., and Roffet-Salque, M. (2017). Dairying history and the evolution of lactase persistence. Cahiers de Nutrition et de Diététique *52*, S19–S24.

Giacalone, D., Ribeiro, L.M., and Frøst, M.B. (2013). Consumer-based product profiling: application of partial napping® for sensory characterization of specialty beers by novices and experts. Journal of Food Products Marketing *19*, 201–218.

Gnaba, A. (2011). Anthropologie des mangeurs de pain (Editions L'Harmattan).

Gobbetti, M. (1998). The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. Trends in Food Science & Technology *9*, 267–274.

Gobbetti, M., and Corsetti, A. (1997). Lactobacillus sanfranciscoa key sourdough lactic acid bacterium: a review. Food Microbiology *14*, 175–188.

Gobbetti, M., and Gänzle, M. (2012a). Handbook on sourdough biotechnology (Springer Science & Business Media).

Gobbetti, M., and Gänzle, M. (2012b). Handbook on sourdough biotechnology (Springer Science & Business Media).

Gobbetti, M., Corsetti, A., and Rossi, J. (1994). The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. Appl Microbiol Biotechnol *41*, 456–460.

Gobbetti, M., Corsetti, A., and Rossi, J. (1996). Lactobacillus sanfrancisco, a key sourdough lactic acid bacterium: physiology, genetic and biotechnology. Advances in Food Sciences *18*, 167–175.

Gobbetti, M., Rizzello, C.G., Di Cagno, R., and De Angelis, M. (2014a). How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. Food Microbiology *37*, 30–40.

Gobbetti, M., Rizzello, C.G., Di Cagno, R., and De Angelis, M. (2014b). How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. Food Microbiology *37*, 30–40.

Gobbetti, M., Minervini, F., Pontonio, E., Di Cagno, R., and De Angelis, M. (2016). Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. International Journal of Food Microbiology *239*, 3–18.

Gobbetti, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Neviani, E., Fox, P.F., and De Angelis, M. (2018). Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. Trends in Food Science & Technology *78*, 244–254.

Gobetti, M., Corsetti, A., and Rossi, J. (1994). The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. World J Microbiol Biotechnol *10*, 275–279.

Goffaux, R., Goldringer, I., Bonneuil, C., Montalent, P., and Bonnin, I. (2011). Quels indicateurs pour suivre la diversité génétique des plantes cultivées. Le Cas Du Blé Tendre Cultivé En France Depuis Un Siècle. Rapport FRB, Série Expertise et Synthèse *44*.

Gori, K., Bjørklund, M.K., Canibe, N., Pedersen, A.Ø., and Jespersen, L. (2011). Occurrence and identification of yeast species in fermented liquid feed for piglets. Microbial Ecology *61*, 146–153.

Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2009). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Molecular Biology and Evolution *27*, 221–224.

Gu, C.T., Wang, F., Li, C.Y., Liu, F., and Huo, G.C. (2012). Lactobacillusxiangfangensis sp. nov., isolated from Chinese pickle. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology *62*, 860–863.

Gu, C.T., Li, C.Y., Yang, L.J., and Huo, G.C. (2013). Lactobacillus heilongjiangensis sp. nov., isolated from Chinese pickle. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology *63*, 4094–4099.

Guellerin, M., Passerini, D., Fontagné-Faucher, C., Robert, H., Gabriel, V., Loux, V., Klopp, C., Loir, Y.L., Coddeville, M., Daveran-Mingot, M.-L., et al. (2016). Complete Genome Sequence of Lactococcus lactis subsp. lactis A12, a Strain Isolated from Wheat Sourdough. Genome Announc. *4*, e00692-16.

Hagman, A., and Piškur, J. (2015). A study on the fundamental mechanism and the evolutionary driving forces behind aerobic fermentation in yeast. PLoS One *10*, e0116942.

Hagman, A., Säll, T., Compagno, C., and Piskur, J. (2013). Yeast "make-accumulate-consume" life strategy evolved as a multi-step process that predates the whole genome duplication. PLOS One *8*, e68734.

Hagman, A., Säll, T., and Piškur, J. (2014). Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin. The FEBS Journal *281*, 4805–4814.

Hammes, W.P., and Vogel, R.F. (1995). The genus lactobacillus. In The Genera of Lactic Acid Bacteria, (Springer), pp. 19–54.

Hansen, A., and Schieberle, P. (2005). Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. Trends in Food Science & Technology *16*, 85–94.

Hansson, A.-M. (1994). Grain-paste, porridge and bread. Ancient Cereal-Based Food. Laborativ Arkeol *7*, 5–20.

Hardoim, P.R., Van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., and Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. Microbiology and Molecular Biology Reviews *79*, 293–320.

Harlan, J.R., and de Wet, J.M. (1965). Some thoughts about weeds. Economic Botany *19*, 16–24.

Harth, H., Van Kerrebroeck, S., and De Vuyst, L. (2016). Community dynamics and metabolite target analysis of spontaneous, backslopped barley sourdough fermentations under laboratory and bakery conditions. International Journal of Food Microbiology *228*, 22–32.

Haudry, A., Cenci, A., Ravel, C., Bataillon, T., Brunel, D., Poncet, C., Hochu, I., Poirier, S., Santoni, S., and Glémin, S. (2007). Grinding up wheat: a massive loss of nucleotide diversity since domestication. Molecular Biology and Evolution *24*, 1506–1517.

Hesse-Biber, S., Dupuis, P., and Kinder, T.S. (1991). HyperRESEARCH: A computer program for the analysis of qualitative data with an emphasis on hypothesis testing and multimedia analysis. Qual Sociol *14*, 289–306.

Hesseltine, C.W., and Graves, R.R. (1966). Microbiology of flours. Economic Botany *20*, 156.

Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, Á., Mas, A., and Guillamón, J.M. (2006). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. Applied and Environmental Microbiology *72*, 7148–7155.

Hittinger, C.T., Steele, J.L., and Ryder, D.S. (2018). Diverse yeasts for diverse fermented beverages and foods. Current Opinion in Biotechnology *49*, 199–206.

Hüfner, E., Britton, R.A., Roos, S., Jonsson, H., and Hertel, C. (2008). Global transcriptional response of Lactobacillus reuteri to the sourdough environment. Systematic and Applied Microbiology *31*, 323–338.

Huys, G., Daniel, H.-M., and Vuyst, L.D. (2013). Taxonomy and Biodiversity of Sourdough Yeasts and Lactic Acid Bacteria. In Handbook on Sourdough Biotechnology, M. Gobbetti, and M. Gänzle, eds. (Springer US), pp. 105–154.

Illeghems, K., De Vuyst, L., Papalexandratou, Z., and Weckx, S. (2012). Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. Plos One *7*, e38040.

Infantes, M. (Institut N. de la R.A., and Schmidt, J.L. (1992). Characterisation of the yeast flora of natural sourdoughs located in various french areas. Sciences des Aliments (France).

Irlinger, F., Layec, S., Helinck, S., and Dugat-Bony, E. (2015). Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. FEMS Microbiol Lett *362*, 1–11.

Ivey, M., Massel, M., and Phister, T.G. (2013). Microbial interactions in food fermentations. Annual Review of Food Science and Technology *4*, 141–162.

Jacques, N., Sarilar, V., Urien, C., Lopes, M.R., Morais, C.G., Uetanabaro, A.P.T., Tinsley, C.R., Rosa, C.A., Sicard, D., and Casaregola, S. (2016). Three novel ascomycetous yeast species of the Kazachstania clade, Kazachstania saulgeensis sp. nov., Kazachstaniaserrabonitensis sp. nov. and Kazachstania australis sp. nov. Reassignment of Candida humilis to Kazachstania humilis fa comb. nov. and Candida pseudohumilis to Kazachstania pseudohumilis fa comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology *66*, 5192–5200.

Jaffrès, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M.F., Prévost, H., Joffraud, J.J., and Dousset, X. (2009). Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. International Journal of Food Microbiology *131*, 20–29.

Joerger, R.D. (2003). Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. Poultry Science *82*, 640–647.

Johnston-Monje, D., and Raizada, M.N. (2011). Conservation and diversity of seed associated endophytes in Zea across boundaries of evolution, ethnography and ecology. PLoS One *6*, e20396.

Joubert, M. (2017). Adéquation des blés durs aux opérations de transformations technologiques: semoulerie et pastification. PhD Thesis. Montpellier, SupAgro.

Kahle, D., and Wickham, H. (2013). ggmap: spatial visualization with ggplot2. R Journal *5*.

Katina, K., Arendt, E., Liukkonen, K.-H., Autio, K., Flander, L., and Poutanen, K. (2005). Potential of sourdough for healthier cereal products. Trends in Food Science & Technology *16*, 104–112.

Katz, S.H., and Voigt, M.M. (1986). Bread and beer. Expedition *28*, 23–34.

Kazou, M., Alexandraki, V., Pot, B., Tsakalidou, E., and Papadimitriou, K. (2017). Complete Genome Sequence of the Sourdough Isolate Lactobacillus zymae ACA-DC 3411. Genome Announc. *5*, e00699-17.

Kitahara, M., Sakata, S., and Benno, Y. (2005). Biodiversity of Lactobacillus sanfranciscensis strains isolated from five sourdoughs. Letters in Applied Microbiology *40*, 353–357.

Klaedtke, S., Jacques, M.-A., Raggi, L., Préveaux, A., Bonneau, S., Negri, V., Chable, V., and Barret, M. (2016). Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages. Environmental Microbiology *18*, 1792–1804.

Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends in Molecular Medicine *8*, 257–260.

Koistinen, V.M., Mattila, O., Katina, K., Poutanen, K., Aura, A.-M., and Hanhineva, K. (2018). Metabolic profiling of sourdough fermented wheat and rye bread. Scientific Reports *8*, 5684.

Kõljalg, U., Larsson, K.-H., Abarenkov, K., Nilsson, R.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjøller, R., Larsson, E., et al. (2005). UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. New Phytologist *166*, 1063–1068.

Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., and Schloss, P.D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. Applied and Environmental Microbiology *79*, 5112–5120.

Kurtzman, C.P. (2003). Phylogenetic circumscription of Saccharomyces, Kluyveromyces and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera Lachancea, Nakaseomyces, Naumovia, Vanderwaltozyma and Zygotorulaspora. FEMS Yeast Research *4*, 233–245.

Kwon, D.Y., and Tamang, J.P. (2015). Religious ethnic foods.

Lacy, R.C. (1987). Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. Conservation Biology *1*, 143–158.

Ladero, V., Alvarez-Sieiro, P., Redruello, B., Rio, B. del, Linares, D.M., Martin, M.C., Fernández, M., and Alvarez, M.A. (2013). Draft Genome Sequence of Lactobacillus plantarum Strain IPLA 88. Genome Announc. *1*, e00524-13.

Laguerre, S., Amari, M., Vuillemin, M., Robert, H., Loux, V., Klopp, C., Morel, S., Gabriel, B., Remaud-Siméon, M., Gabriel, V., et al. (2012). Genome Sequences of Three Leuconostoc citreum Strains, LBAE C10, LBAE C11, and LBAE E16, Isolated from Wheat Sourdoughs. J. Bacteriol. *194*, 1610–1611.

Lattanzi, A., Minervini, F., Di Cagno, R., Diviccaro, A., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., De Angelis, M., and Gobbetti, M. (2013). The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. International Journal of Food Microbiology *163*, 71–79.

Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008). FactoMineR: an R package for multivariate analysis. Journal of Statistical Software *25*, 1–18.

Lechopier, N. (2013). Recherches participatives et partage de résultats scientifiques. Quels enjeux? Bulletin Recherche de l'Institut Français de l'Education *20*, 5–7.

Lee, H., Baek, H., Lim, S.B., Hur, J.S., Shim, S., Shin, S.-Y., Han, N.S., and Seo, J.-H. (2015). Development of species-specific PCR primers and polyphasic characterization of Lactobacillus sanfranciscensis isolated from Korean sourdough. International Journal of Food Microbiology *200*, 80–86.

Leek, F.F. (1972). Teeth and bread in ancient Egypt. The Journal of Egyptian Archaeology *58*, 126–132.

Legras, J.-L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., and Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: Saccharomyces cerevisiae diversity reflects human history. Molecular Ecology *16*, 2091–2102.

Levey, D.J. (2004). The evolutionary ecology of ethanol production and alcoholism. Integrative and Comparative Biology *44*, 284–289.

Lhomme, E. (2015). Description et caractérisation de la diversité bactérienne des levains de panification français par approche moléculaire.

Lhomme, E., Urien, C., Legrand, J., Dousset, X., Onno, B., and Sicard, D. (2014). Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. Food Microbiology.

Lhomme, E., Orain, S., Courcoux, P., Onno, B., and Dousset, X. (2015a). The predominance of Lactobacillus sanfranciscensis in French organic sourdoughs and its impact on related bread characteristics. International Journal of Food Microbiology *213*, 40–48.

Lhomme, E., Lattanzi, A., Dousset, X., Minervini, F., De Angelis, M., Lacaze, G., Onno, B., and Gobbetti, M. (2015b). Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs. International Journal of Food Microbiology *215*, 161–170.

Lhomme, E., Dousset, X., and Onno, B. (2016a). Les levains de panification: Microbiote et Fonctionnalités (Éditions universitaires européennes).

Lhomme, E., Onno, B., Chuat, V., Durand, K., Orain, S., Valence, F., Dousset, X., and Jacques, M.-A. (2016b). Genotypic diversity of Lactobacillus sanfranciscensis strains isolated from French organic sourdoughs. International Journal of Food Microbiology *226*, 13–19.

Lhomme, E., Urien, C., Legrand, J., Dousset, X., Onno, B., and Sicard, D. (2016c). Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. Food Microbiology *53*, *Part A*, 41–50.

Li, H., Li, Z., Qu, J., and Wang, J. (2017). Bacterial diversity in traditional Jiaozi and sourdough revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. LWT - Food Science and Technology *81*, 319–325.

Lian, J., Mishra, S., and Zhao, H. (2018). Recent advances in metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae: New tools and their applications. Metabolic Engineering.

Liang, H., Chen, H., Zhang, W., Yu, C., Ji, C., and Lin, X. (2018). Investigation on microbial diversity of industrial Zhacai paocai during fermentation using high-throughput sequencing and their functional characterization. LWT *91*, 460–466.

Libkind, D., Hittinger, C.T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P., and Sampaio, J.P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 14539–14544.

Lin, X.B., and Gänzle, M.G. (2014). Quantitative high-resolution melting PCR analysis for monitoring of fermentation microbiota in sourdough. International Journal of Food Microbiology *186*, 42–48.

Links, M.G., Demeke, T., Gräfenhan, T., Hill, J.E., Hemmingsen, S.M., and Dumonceaux, T.J. (2014). Simultaneous profiling of seed-associated bacteria and fungi reveals antagonistic interactions between microorganisms within a shared epiphytic microbiome on Triticum and Brassica seeds. New Phytologist *202*, 542–553.

Liu, T., Li, Y., Chen, J., Sadiq, F.A., Zhang, G., Li, Y., and He, G. (2016). Prevalence and diversity of lactic acid bacteria in Chinese traditional sourdough revealed by culture dependent and pyrosequencing approaches. LWT - Food Science and Technology *68*, 91–97.

Liu, X., Zhou, M., Jiaxin, C., Luo, Y., Ye, F., Jiao, S., Hu, X., Zhang, J., and Lü, X. (2018). Bacterial diversity in traditional sourdough from different regions in China. LWT *96*, 251–259.

Loponen, J., Gänzle, M., Loponen, J., and Gänzle, M.G. (2018). Use of Sourdough in Low FODMAP Baking. Foods *7*, 96.

Lortal, S. (2015). Ferments et aliments: une longue histoire riche d'enseignements. Innovations Agronomiques *44*, 1–13.

Luo, G., Song, S., Zhao, L., Shen, L., Song, Y., Wang, X., Yu, K., Liu, Z., Li, Y., Yang, W., et al. (2018). Mechanisms, origin and heredity of Glu-1Ay silencing in wheat evolution and domestication. Theor Appl Genet *131*, 1561–1575.

Lynch, K.M., Lucid, A., Arendt, E.K., Sleator, R.D., Lucey, B., and Coffey, A. (2015). Genomics of Weissella cibaria with an examination of its metabolic traits. Microbiology *161*, 914–930.

Macé, S., Mamlouk, K., Chipchakova, S., Prévost, H., Joffraud, J.-J., Dalgaard, P., Pilet, M.-F., and Dousset, X. (2013). Development of a rapid real-time PCR method as a tool to quantify viable Photobacterium phosphoreum bacteria in salmon (Salmo salar) steaks. Applied and Environmental Microbiology *79*, 2612–2619.

Magoč, T., and Salzberg, S.L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. Bioinformatics *27*, 2957–2963.

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., and Dunthorn, M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. PeerJ *2*, e593.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., and Polouchine, N. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences *103*, 15611–15616.

Mäntynen, V.H., Korhola, M., Gudmundsson, H., Turakainen, H., Alfredsson, G.A., Salovaara, H., and LindstrÖm, K. (1999). A Polyphasic Study on the Taxonomic Position of Industrial Sour Dough Yeasts. Systematic and Applied Microbiology *22*, 87–96.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet. Journal *17*, pp–10.

Martin, K.J., and Rygiewicz, P.T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiology *5*, 28.

Martino, M.E., Bayjanov, J.R., Caffrey, B.E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., Gillet, B., Kleerebezem, M., Hijum, S.A.F.T. van, and Leulier, F. (2016). Nomadic lifestyle of Lactobacillus plantarum revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. Environmental Microbiology *18*, 4974–4989.

McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C., et al. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. PNAS *101*, 17593–17598.

McMurdie, P.J., and Holmes, S. (2013a). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLOS ONE *8*, e61217.

McMurdie, P.J., and Holmes, S. (2013b). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PloS One *8*, e61217.

Meignen, B., Onno, B., Gélinas, P., Infantes, M., Guilois, S., and Cahagnier, B. (2001). Optimization of sourdough fermentation with Lactobacillus brevis and baker's yeast. Food Microbiology *18*, 239–245.

Meroth, C.B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M.J., and Hammes, W.P. (2003). Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology *69*, 475–482.

Meulen, R.V. der, Scheirlinck, I., Schoor, A.V., Huys, G., Vancanneyt, M., Vandamme, P., and Vuyst, L.D. (2007). Population Dynamics and Metabolite Target Analysis of Lactic Acid Bacteria during Laboratory Fermentations of Wheat and Spelt Sourdoughs. Appl. Environ. Microbiol. *73*, 4741–4750.

Michel, E., Monfort, C., Deffrasnes, M., Guezenec, S., Lhomme, E., Barret, M., Sicard, D., Dousset, X., and Onno, B. (2016). Characterization of relative abundance of lactic acid bacteria species in French organic sourdough by cultural, qPCR and MiSeq high-throughput sequencing methods. International Journal of Food Microbiology *239*, 35–43.

Middelhoven, W.J., Kurtzman, C.P., and Vaughan-Martini, A. (2000). Saccharomyces bulderi sp. nov., a yeast that ferments gluconolactone. Antonie van Leeuwenhoek *77*, 223–228.

Minervini, F., Cagno, R.D., Lattanzi, A., Angelis, M.D., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., and Gobbetti, M. (2012). Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiotas of 19 Sourdoughs Used for Traditional/Typical Italian Breads: Interactions between Ingredients and Microbial Species Diversity. Appl. Environ. Microbiol. *78*, 1251–1264.

Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., and Gobbetti, M. (2014). Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. International Journal of Food Microbiology *171*, 136–146.

Minervini, F., Celano, G., Lattanzi, A., Tedone, L., De Mastro, G., Gobbetti, M., and De Angelis, M. (2015a). Lactic acid bacteria in durum wheat flour are endophytic components of the plant during its entire life cycle. Applied and Environmental Microbiology *81*, 6736–6748.

Minervini, F., Lattanzi, A., De Angelis, M., Celano, G., and Gobbetti, M. (2015b). House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs. Food Microbiology *52*, 66–76.

Minervini, F., Lattanzi, A., Dinardo, F.R., De Angelis, M., and Gobbetti, M. (2018a). Wheat endophytic lactobacilli drive the microbial and biochemical features of sourdoughs. Food Microbiology *70*, 162–171.

Minervini, F., Dinardo, F.R., CELANO, G., De Angelis, M., and Gobbetti, M. (2018b). Lactic acid bacterium population dynamics in artisan sourdoughs over one year of daily propagations is mainly driven by flour microbiota and nutrients. Frontiers in Microbiology *9*, 1984.

Monnet, C., Landaud, S., Bonnarme, P., and Swennen, D. (2015). Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. FEMS Microbiology Letters *362*, 1–9.

Morrison, I.N., Kuo, J., and O'Brien, T.P. (1975). Histochemistry and fine structure of developing wheat aleurone cells. Planta *123*, 105–116.

Mounier, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G.F., and Cogan, T.M. (2005). Surface microflora of four smear-ripened cheeses. Applied and Environmental Microbiology *71*, 6489–6500.

Nair, B.M., and Prajapati, J.B. (2003). The history of fermented foods. In Handbook of Fermented Functional Foods, (CRC Press), pp. 17–42.

Naser, S.M., Dawyndt, P., Hoste, B., Gevers, D., Vandemeulebroecke, K., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., and Swings, J. (2007). Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology *57*, 2777–2789.

Nuobariene, L., Cizeikiene, D., Gradzeviciute, E., Hansen, \AAse S., Rasmussen, S.K., Juodeikiene, G., and Vogensen, F.K. (2015). Phytase-active lactic acid bacteria from sourdoughs: Isolation and identification. LWT-Food Science and Technology *63*, 766–772.

Obiri-Danso, K. (1994). Microbiological studies on corn dough fermentation. Cereal Chemistry *71*, 186–188.

O'DONNELL, K. (1993). Fusarium and its near relatives. The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics 225–233.

O'Flaherty, S., Crawley, A.B., Theriot, C.M., and Barrangou, R. (2018). The Lactobacillus Bile Salt Hydrolase Repertoire Reveals Niche-Specific Adaptation. MSphere *3*, e00140-18.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., and Mcglinn, D. (2016). Package "Vegan" Title Community Ecology Package.

Onno, B. (1994). La panification française. Les Levains.(R. Guinet and B. Godon, Eds.). Tec et Doc Lavoisier, Paris 201–215.

Ortea, I., O'Connor, G., and Maquet, A. (2016). Review on proteomics for food authentication. Journal of Proteomics *147*, 212–225.

Osborne, J.P., and Edwards, C.G. (2007). Inhibition of malolactic fermentation by a peptide produced by Saccharomyces cerevisiae during alcoholic fermentation. International Journal of Food Microbiology *118*, 27–34.

Paramithiotis, S., Gioulatos, S., Tsakalidou, E., and Kalantzopoulos, G. (2006). Interactions between Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria in sourdough. Process Biochemistry *41*, 2429–2433.

Paramithiotis, S., Tsiasiotou, S., and Drosinos, E.H. (2010). Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. European Food Research and Technology *231*, 883–890.

Passerini, D., Coddeville, M., Bourgeois, P.L., Loubière, P., Ritzenthaler, P., Fontagné-Faucher, C., Daveran-Mingot, M.-L., and Cocaign-Bousquet, M. (2013). The Carbohydrate Metabolism Signature of Lactococcus lactis Strain A12 Reveals Its Sourdough Ecosystem Origin. Appl. Environ. Microbiol. *79*, 5844–5852.

Pasteur, L. (1857). Mémoire sur la fermentation alcoolique.

Pearson, A.M., and Gillett, T.A. (1996). Sausages. In Processed Meats, (Springer), pp. 210–241.

Peng, J.H., Sun, D., and Nevo, E. (2011). Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. Molecular Breeding *28*, 281.

Peris, D., Sylvester, K., Libkind, D., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., Alexander, W.G., and Hittinger, C.T. (2014). Population structure and reticulate evolution of Saccharomyces eubayanus and its lager-brewing hybrids. Molecular Ecology *23*, 2031–2045.

Perronne, R., and Goldringer, I. (2018). Application of a partitioning procedure based on Rao quadratic entropy index to characterize the temporal evolution of in situ varietal and genetic diversity of bread wheat in France over the period 1981–2006. Theor Appl Genet *131*, 775–786.

Pétel, C., Onno, B., and Prost, C. (2017). Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. Trends in Food Science & Technology *59*, 105–123.

Picozzi, C., Bonacina, G., Vigentini, I., and Foschino, R. (2010). Genetic diversity in Italian Lactobacillus sanfranciscensis strains assessed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis analyses. Microbiology *156*, 2035–2045.

Piškur, J., Rozpędowska, E., Polakova, S., Merico, A., and Compagno, C. (2006). How did Saccharomyces evolve to become a good brewer? TRENDS in Genetics *22*, 183–186.

Ponomarova, O., Gabrielli, N., Sévin, D.C., Mülleder, M., Zirngibl, K., Bulyha, K., Andrejev, S., Kafkia, E., Typas, A., and Sauer, U. (2017). Yeast creates a niche for symbiotic lactic acid bacteria through nitrogen overflow. Cell Systems *5*, 345–357.

Pontonio, E., Rizzello, C.G., Di Cagno, R., Dousset, X., Clément, H., Filannino, P., Onno, B., and Gobbetti, M. (2016). How organic farming of wheat may affect the sourdough and the nutritional and technological features of leavened baked goods. International Journal of Food Microbiology *239*, 44–53.

Pontonio, E., Di Cagno, R., Tarraf, W., Filannino, P., De Mastro, G., and Gobbetti, M. (2018). Dynamic and Assembly of Epiphyte and Endophyte Lactic Acid Bacteria During the Life Cycle of Origanum vulgare L. Front. Microbiol. *9*.

Porras-Alfaro, A., and Bayman, P. (2011). Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. Annual Review of Phytopathology *49*, 291–315.

Pot, B., and Tsakalidou, E. (2009). Taxonomy and metabolism of Lactobacillus. Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics *1*, 1–56.

Prajapati, J.B., and Nair, B.M. (2008). Handbook of fermented functional foods (Taylor & Francis Group, London).

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., and Glöckner, F.O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acids Research *35*, 7188–7196.

Pulvirenti, A., Solieri, L., Gullo, M., De Vero, L., and Giudici, P. (2004). Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. Letters in Applied Microbiology *38*, 113–117.

Quijada, N.M., Mann, E., Wagner, M., Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., and Schmitz-Esser, S. (2018). Autochthonous facility-specific microbiota dominates washed-rind Austrian hard cheese surfaces and its production environment. International Journal of Food Microbiology *267*, 54–61.

Raimondi, S., Amaretti, A., Rossi, M., Fall, P.A., Tabanelli, G., Gardini, F., and Montanari, C. (2017). Evolution of microbial community and chemical properties of a sourdough during the production of Colomba, an Italian sweet leavened baked product. LWT *86*, 31–39.

Ramsayer, J., and Sicard, D. (2015). Explorer et conserver la diversité de la flore des levains, un potentiel en boulangerie. Innovations Agronomiques (44), 45-54.(2015).

Ravyts, F., Vuyst, L.D., and Leroy, F. (2012). Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. Engineering in Life Sciences *12*, 356–367.

Regenstein, J.M., Chaudry, M.M., and Regenstein, C.E. The Kosher and Halal Food Laws. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety *2*, 111–127.

Réguerre, A.-L., Chiron, H., Shehzad, A., and Della Valle, G. Suivi de fermentation de la pâte à pain par imagerie.

Reinert, M. (1986). Un logiciel d'analyse lexicale. Les Cahiers de l'analyse Des Données *11*, 471–481.

Reva, O.N., Zaets, I.E., Ovcharenko, L.P., Kukharenko, O.E., Shpylova, S.P., Podolich, O.V., de Vera, J.-P., and Kozyrovska, N.O. (2015). Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. AMB Express *5*, 35.

Ripari, V., Gänzle, M.G., and Berardi, E. (2016a). Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials. International Journal of Food Microbiology *232*, 35–42.

Ripari, V., Cecchi, T., and Berardi, E. (2016b). Microbiological characterisation and volatiles profile of model, ex-novo, and traditional Italian white wheat sourdoughs. Food Chemistry *205*, 297–307.

Rizzello, C.G., Nionelli, L., Coda, R., De Angelis, M., and Gobbetti, M. (2010). Effect of sourdough fermentation on stabilisation, and chemical and nutritional characteristics of wheat germ. Food Chemistry *119*, 1079–1089.

Rizzello, C.G., Cavoski, I., Turk, J., Ercolini, D., Nionelli, L., Pontonio, E., De Angelis, M., De Filippis, F., Gobbetti, M., and Di Cagno, R. (2015). Organic cultivation of Triticum turgidum subsp.

durum is reflected in the flour-sourdough fermentation-bread axis. Applied and Environmental Microbiology *81*, 3192–3204.

Robert, H., Gabriel, V., and Fontagné-Faucher, C. (2009a). Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. International Journal of Food Microbiology *135*, 53–59.

Robert, H., Gabriel, V., and Fontagné-Faucher, C. (2009b). Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. International Journal of Food Microbiology *135*, 53–59.

Rodríguez, C.E., Mitter, B., Barret, M., Sessitsch, A., and Compant, S. (2018). Commentary: seed bacterial inhabitants and their routes of colonization. Plant Soil *422*, 129–134.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ *4*, e2584.

Ropars, J., López-Villavicencio, M., Snirc, A., Lacoste, S., and Giraud, T. (2017). Blue cheese-making has shaped the population genetic structure of the mould Penicillium roqueforti. PloS One *12*, e0171387.

Rosenquist, H., and Hansen, Å. (2000). The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. Food Microbiology *17*, 241–250.

Roussel, P., Chiron, H., and Paillard, G. (2002). Les pains français: évolution, qualité, production (Maé-Erti).

Roussel, P., Chiron, H., Della Valle, G., and Ndiaye, A. (2010). Recueil de connaissances sur les descripteurs de qualité des pâtes et des pains ou variables d'état pour la panification française. Glossaire terminologique appliqué aux pains français. Recueil de Connaissances Sur Les Descripteurs de Qualité Des Pâtes et Des Pains Ou Variables d'état Pour La Panification Française. Glossaire Terminologique Appliqué Aux Pains Français (2010).

Sabra, W., Dietz, D., Tjahjasari, D., and Zeng, A.-P. (2010). Biosystems analysis and engineering of microbial consortia for industrial biotechnology. Engineering in Life Sciences *10*, 407–421.

Saeed, M., Anjum, F.M., Tahir, Z., and Haq, N. (2009). Isolation and characterization of starter culture from spontaneous fermentation of sourdough. International Journal of Agriculture and Biology *11*, 329–332.

Salque, M., Bogucki, P.I., Pyzel, J., Sobkowiak-Tabaka, I., Grygiel, R., Szmyt, M., and Evershed, R.P. (2013). Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. Nature *493*, 522.

Salvetti, E., Harris, H.M.B., Felis, G.E., and O'Toole, P.W. (2018). Comparative genomics reveals robust phylogroups in the genus *Lactobacillus* as the basis for reclassification. Applied and Environmental Microbiology AEM.00993-18.

Samuel, D. (2002). Bread in archaeology. Civilisations. Revue Internationale d'anthropologie et de Sciences Humaines 27–36.

Sarilar, V., Sterck, L., Matsumoto, S., Jacques, N., Neuvéglise, C., Tinsley, C.R., Sicard, D., and Casaregola, S. (2017). Genome sequence of the type strain CLIB 1764T (= CBS 14374T) of the yeast species Kazachstania saulgeensis isolated from French organic sourdough. Genomics Data *13*, 41–43.

Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vandamme, P., and Huys, G. (2008). Taxonomic structure and stability of the bacterial community in Belgian sourdough ecosystems as assessed by culture and population fingerprinting. Applied and Environmental Microbiology *74*, 2414–2423.

Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., De Vuyst, L., Vandamme, P., and Huys, G. (2009). Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments. Journal of Applied Microbiology *106*, 1081–1092.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology *75*, 7537–7541.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., and Consortium, F.B. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. PNAS *109*, 6241–6246.

Seth, E.C., and Taga, M.E. (2014). Nutrient cross-feeding in the microbial world. Frontiers in Microbiology *5*, 350.

Shade, A., Jacques, M.-A., and Barret, M. (2017). Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. Current Opinion in Microbiology *37*, 15–22.

Shevchenko, A., Yang, Y., Knaust, A., Thomas, H., Jiang, H., Lu, E., Wang, C., and Shevchenko, A. (2014). Proteomics identifies the composition and manufacturing recipe of the 2500-year old sourdough bread from Subeixi cemetery in China. Journal of Proteomics *105*, 363–371.

Shewry, P.R., Tatham, A.S., Forde, J., Kreis, M., and Miflin, B.J. (1986). The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. Journal of Cereal Science *4*, 97–106.

Siepmann, F.B., Ripari, V., Waszczynskyj, N., and Spier, M.R. (2017). Overview of Sourdough Technology: from Production to Marketing. Food and Bioprocess Technology 1–29.

Sieuwerts, S., Bron, P.A., and Smid, E.J. (2018). Mutually stimulating interactions between lactic acid bacteria and Saccharomyces cerevisiae in sourdough fermentation. LWT - Food Science and Technology *90*, 201–206.

Spiegel, H., Sager, M., Oberforster, M., Mechtler, K., Stüger, H.P., and Baumgarten, A. (2009). Nutritionally relevant elements in staple foods: influence of arable site versus choice of variety. Environ Geochem Health *31*, 549–560.

Stackebrandt, E., and Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiology Today *33*, 152.

Steensels, J., and Verstrepen, K.J. (2014). Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. Annual Review of Microbiology *68*, 61–80.

Stefanini, I. (2018). Yeast-insect associations: It takes guts. Yeast *35*, 315–330.

Stolz, P., and Böcker, G. (1996). Technology, properties and applications of sourdough products. Advances in Food Sciences *18*, 234–236.

Stolz, P., Vogel, R.F., and Hammes, W.P. (1995). Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung *201*, 402–410.

Succi, M., Reale, A., Andrighetto, C., Lombardi, A., Sorrentino, E., and Coppola, R. (2003). Presence of yeasts in southern Italian sourdoughs from Triticum aestivum flour. FEMS Microbiology Letters *225*, 143–148.

Sugihara, T.F., Kline, L., and Miller, M.W. (1971). Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process I. Yeasts responsible for the leavening action. Applied Microbiology *21*, 456–458.

Sun, Z., Harris, H.M., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, I.B., Cooney, J.C., Kagawa, T.F., et al. (2015). Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. Nature Communications *6*.

SURGET, A., and BARRON, C. (2005). Histologie du grain de blé. Industries Des Céréales 3–7.

Tamang, J.P., Watanabe, K., and Holzapfel, W.H. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. Front. Microbiol. *7*.

Team, Rs. (2015). RStudio: integrated development for R. RStudio, Inc., Boston, MA.

Thiele, C., Gänzle, M.G., and Vogel, R.F. (2002). Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. Cereal Chemistry *79*, 45–51.

Thines, M. (2014). Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes—a global overview. European Journal of Plant Pathology *138*, 431–447.

This, P., Lacombe, T., and Thomas, M.R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. Trends in Genetics *22*, 511–519.

Thomson, J.M., Gaucher, E.A., Burgan, M.F., De Kee, D.W., Li, T., Aris, J.P., and Benner, S.A. (2005). Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. Nature Genetics *37*, 630.

Torres, A.C., Suárez, N.E., Font, G., Saavedra, L., and Taranto, M.P. (2016). Draft Genome Sequence of Lactobacillus reuteri Strain CRL 1098, an Interesting Candidate for Functional Food Development. Genome Announc. *4*, e00806-16.

Torriani, S., Felis, G.E., and Dellaglio, F. (2001). Differentiation of Lactobacillus plantarum, L. pentosus, and L. paraplantarum by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. Applied and Environmental Microbiology *67*, 3450–3454.

Tresset, A., and Vigne, J.-D. (2011). Last hunter-gatherers and first farmers of Europe. Comptes Rendus Biologies *334*, 182–189.

Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., and Vangronsveld, J. (2015). Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. Environmental Microbiology Reports *7*, 40–50.

Turcotte, M.M., Araki, H., Karp, D.S., Poveda, K., and Whitehead, S.R. (2017). The eco-evolutionary impacts of domestication and agricultural practices on wild species. Phil. Trans. R. Soc. B *372*, 20160033.

Urien, C. (2015). Diversité des espèces de levures dans des levains naturels français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique: une étude pilote pour analyser les pratiques boulangères et les patterns des communautés microbiennes. PhD Thesis. Université Paris Sud-Paris XI.

Vadkertiová, R., Dudášová, H., and Balaščáková, M. (2017). Yeasts in agricultural and managed soils. In Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity, (Springer), pp. 117–144.

Valamoti, S.M., Mangafa, M., Koukouli-Chrysanthaki, C., and Malamidou, D. (2007). Grape-pressings from northern Greece: the earliest wine in the Aegean? Antiquity *81*, 54–61.

Valcheva, R., Korakli, M., Onno, B., Prévost, H., Ivanova, I., Ehrmann, M.A., Dousset, X., Gänzle, M.G., and Vogel, R.F. (2005). Lactobacillus hammesii sp. nov., isolated from French sourdough. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology *55*, 763–767.

Valcheva, R., Ferchichi, M.F., Korakli, M., Ivanova, I., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., Prévost, H., Onno, B., and Dousset, X. (2006). Lactobacillus nantensis sp. nov., isolated from French wheat sourdough. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology *56*, 587–591.

Valmorri, S., Tofalo, R., Settanni, L., Corsetti, A., and Suzzi, G. (2010). Yeast microbiota associated with spontaneous sourdough fermentations in the production of traditional wheat sourdough breads of the Abruzzo region (Italy). Antonie Van Leeuwenhoek *97*, 119–129.

Van Kerrebroeck, S., Bastos, F.C.C., Harth, H., and De Vuyst, L. (2016). A low pH does not determine the community dynamics of spontaneously developed backslopped liquid wheat sourdoughs but does influence their metabolite kinetics. International Journal of Food Microbiology *239*, 54–64.

Van Kerrebroeck, S., Maes, D., and De Vuyst, L. (2017). Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis. Trends in Food Science & Technology *68*, 152–159.

Venturi, M., Guerrini, S., Granchi, L., and Vincenzini, M. (2012a). Typing of Lactobacillus sanfranciscensis isolates from traditional sourdoughs by combining conventional and multiplex RAPD–PCR profiles. International Journal of Food Microbiology *156*, 122–126.

Venturi, M., Guerrini, S., and Vincenzini, M. (2012b). Stable and non-competitive association of Saccharomyces cerevisiae, Candida milleri and Lactobacillus sanfranciscensis during manufacture of two traditional sourdough baked goods. Food Microbiology *31*, 107–115.

Vera, A., Rigobello, V., and Demarigny, Y. (2009). Comparative study of culture media used for sourdough lactobacilli. Food Microbiology *26*, 728–733.

Vera, A., Ly-Chatain, M.H., Rigobello, V., and Demarigny, Y. (2012). Description of a French natural wheat sourdough over 10 consecutive days focussing on the lactobacilli present in the microbiota. Antonie van Leeuwenhoek *101*, 369–377.

Verce, M., Vuyst, L.D., and Weckx, S. (2018). Complete and Annotated Genome Sequence of the Sourdough Lactic Acid Bacterium Lactobacillus fermentum IMDO 130101. Genome Announc. *6*, e00256-18.

Vermeulen, N., Pavlovic, M., Ehrmann, M.A., Gänzle, M.G., and Vogel, R.F. (2005). Functional characterization of the proteolytic system of Lactobacillus sanfranciscensis DSM 20451T during growth in sourdough. Applied and Environmental Microbiology *71*, 6260–6266.

Vernocchi, P., Valmorri, S., Gatto, V., Torriani, S., Gianotti, A., Suzzi, G., Guerzoni, M.E., and Gardini, F. (2004a). A survey on yeast microbiota associated with an Italian traditional sweet-leavened baked good fermentation. Food Research International *37*, 469–476.

Vernocchi, P., Valmorri, S., Dalai, I., Torriani, S., Gianotti, A., Suzzi, G., Guerzoni, M.E., Mastrocola, D., and Gardini, F. (2004b). Characterization of the yeast population involved in the production of a typical Italian bread. Journal of Food Science *69*, 182–186.

Vigne, J.-D. (2011). The origins of animal domestication and husbandry: A major change in the history of humanity and the biosphere. Comptes Rendus Biologies *334*, 171–181.

Viiard, E., Mihhalevski, A., Rühka, T., Paalme, T., and Sarand, I. (2013). Evaluation of the microbial community in industrial rye sourdough upon continuous back–slopping propagation revealed Lactobacillus helveticus as the dominant species. Journal of Applied Microbiology *114*, 404–412.

Vogel, R.F., BöCKER, G., Stolz, P., Ehrmann, M., Fanta, D., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K., SCHLEIFER, K.H., and Hammes, W.P. (1994). Identification of lactobacilli from sourdough and description of Lactobacillus pontis sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology *44*, 223–229.

Vogel, R.F., Pavlovic, M., Ehrmann, M.A., Wiezer, A., Liesegang, H., Offschanka, S., Voget, S., Angelov, A., Böcker, G., and Liebl, W. (2011). Genomic analysis reveals Lactobacillus sanfranciscensis as stable element in traditional sourdoughs. Microb Cell Fact *10*, S6.

Vogelmann, S.A., and Hertel, C. (2011). Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. Food Microbiology *28*, 583–589.

Vogelmann, S.A., Seitter, M., Singer, U., Brandt, M.J., and Hertel, C. (2009). Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. International Journal of Food Microbiology *130*, 205–212.

Vrancken, G., De Vuyst, L., Van der Meulen, R., Huys, G., Vandamme, P., and Daniel, H.-M. (2010). Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. FEMS Yeast Research *10*, 471–481.

Vu, D., Groenewald, M., Szöke, S., Cardinali, G., Eberhardt, U., Stielow, B., de Vries, M., Verkleij, G.J.M., Crous, P.W., Boekhout, T., et al. (2016). DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. Studies in Mycology *85*, 91–105.

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., and Cole, J.R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and Environmental Microbiology *73*, 5261–5267.

Wang, X., Du, H., Zhang, Y., and Xu, Y. (2018). Environmental Microbiota Drives Microbial Succession and Metabolic Profiles during Chinese Liquor Fermentation. Applied and Environmental Microbiology *84*, e02369–17.

Weckx, S., Van der Meulen, R., Maes, D., Scheirlinck, I., Huys, G., Vandamme, P., and De Vuyst, L. (2010). Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. Food Microbiology *27*, 1000–1008.

Weckx, S., Allemeersch, J., Van der Meulen, R., Vrancken, G., Huys, G., Vandamme, P., Van Hummelen, P., and De Vuyst, L. (2011). Metatranscriptome analysis for insight into whole-ecosystem gene expression during spontaneous wheat and spelt sourdough fermentations. Applied and Environmental Microbiology *77*, 618–626.

Weckx, S., Van Kerrebroeck, S., and De Vuyst, L. (2018). Omics approaches to understand sourdough fermentation processes. International Journal of Food Microbiology.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology *173*, 697–703.

Weiss, S., Samson, F., Navarro, D., and Casaregola, S. (2013). YeastIP: a database for identification and phylogeny of Saccharomycotina yeasts. FEMS Yeast Research *13*, 117–125.

Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, E.B., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S., and von Wright, A. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. Trends in Food Science & Technology *15*, 498–505.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W., and others (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications *18*, 315–322.

Wickham, H. (2016). ggplot2: elegant graphics for data analysis (Springer).

Yurkov, A.M. (2018). Yeasts of the soil–obscure but precious. Yeast *35*, 369–378.

Zannini, E., Garofalo, C., Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., and Clementi, F. (2009). Microbiological and technological characterization of sourdoughs destined for bread-making with barley flour. Food Microbiology *26*, 744–753.

Zeder, M.A. (2008). Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 11597–11604.

Zeppa, G., Conterno, L., and Gerbi, V. (2001). Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry *49*, 2722–2726.

Zhang, G., Sadiq, F.A., Zhu, L., Liu, T., Yang, H., Wang, X., and He, G. (2015). Investigation of Microbial Communities of Chinese Sourdoughs Using Culture-Dependent and DGGE Approaches. Journal of Food Science *80*, M2535–M2542.

Zhang, J., Liu, W., Sun, Z., Bao, Q., Wang, F., Yu, J., Chen, W., and Zhang, H. (2011). Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in Inner Mongolia of China. Food Control *22*, 767–774.

Zhang, Y., Skaar, I., Sulyok, M., Liu, X., Rao, M., and Taylor, J.W. (2016). The microbiome and metabolites in fermented Pu-erh tea as revealed by high-throughput sequencing and quantitative multiplex metabolite analysis. PLoS One *11*, e0157847.

Zheng, B., Jiang, X., Cheng, H., Xu, Z., Li, A., Hu, X., and Xiao, Y. (2015). Complete genome sequence of Lactobacillus heilongjiangensis DSM 28069T: Insight into its probiotic potential. Journal of Biotechnology *216*, 65–66.

Zhu, Y., Fang, D., Shi, D., Li, A., Lv, L., Yan, R., Yao, J., Hua, D., Hu, X., Guo, F., et al. (2015). Draft Genome Sequence of Lactobacillus panis DSM 6035T, First Isolated from Sourdough. Genome Announc. *3*, e00778-15.

(2013). The NCBI Handbook (National Center for Biotechnology Information (US)).

Masson, E. et Bubendorff, S. (2016) Représentations sociales de l'alimentation et consommations éco-citoyennes : une nouvelle appropriation de son alimentation ? 13e Conférence internationale sur les Représentations Sociales (CIRS). 14-17 septembre 2016, Marseille (France).

Dispersion, sélection et rôle des espèces microbiennes des levains en boulangerie française à faible intrant

Le pain a une importance historique et culturelle en France. Or, la diversité des pratiques des boulangers français n'a jamais été décrite ni reliée à la biodiversité. L'industrialisation du 20ème siècle a promu l'utilisation de levure starters et la standardisation. Considérant des enjeux sociétaux et environnementaux, des paysans-boulangers et des boulangers utilisent maintenant le levain comme agent de pousse, une pâte naturellement fermentée composée de farine, d'eau, de bactéries et de levures. L'objectif de mon doctorat était i) de caractériser la diversité microbienne des levains et d'analyser les facteurs la structurant, ii) de suivre la dispersion et la sélection des espèces microbiennes de la graine au pain, iii) de tester l'effet du terroir, des variétés de blé et du levain sur les propriétés nutritionnelles et organoleptiques du pain. Cette recherche a émergé d'une construction participative par des boulangers, des paysans et des scientifiques. Nous avons montré que la France héberge une grande diversité d'espèces microbiennes. Deux grands groupes de pratiques, boulangers et paysans-boulangers, structurent la diversité d'espèces de levures. L'espèce bactérienne dominante semble issue de la farine, la levure de l'environnement levain. La dynamique de sélection au cours des rafraîchis diffèrent pour les bactéries et les levures. La qualité de pain résulte d'interactions entre le levain, les variétés de blé et le terroir. Globalement, nos résultats soulignent le rôle des pratiques agronomiques et boulangères à chaque étape de la chaîne et documentent le rôle de la domestication dans la dispersion et la sélection de la diversité d'espèce microbienne.

Mots-clés : boulangerie, recherche participative, écologie microbienne, bactéries lactiques, levures, domestication des microorganismes, paysans-boulangers, boulangers, levain

---

Dispersion, selection and effect of sourdough microbial species in low-input French bakery

Bread has a historical and cultural importance in France. However, the diversity of the French bakers' practices was never described and linked to the biodiversity. During the 20th century, industrialization promoted the use of yeast starters and standardized processes. However, becoming more aware of global changes, some farmers-bakers and bakers now use sourdough as a fermenting agent, a naturally fermented dough composed of flour, water, bacteria and yeasts. The goal of my PhD was a) to characterize their sourdough microbial species diversity and to analyse its structuring factors, b) to follow the microbial species dispersion and selection from seed to bread, and c) to test the terroir, wheat variety type and sourdough effects on bread's nutritional and organoleptic properties. This research emerged from a participatory co-construction by bakers, farmers and scientists. We showed that France hosts a wide species diversity in sourdough. Two main groups of practices, the baker and farmer-baker like practices, structured the yeast species diversity. The dominant bacterium seems to come from the flour while yeast dominant species seems to come from the house microbiota. The dynamic of selection over backsloppings differed for bacteria and yeasts. The bread quality results from the interaction between the sourdough, the wheat varieties and the wheat terroir. Overall, our results highlight the role of agronomic and bakery practices on each step of the chain and documented the role of domestication in the dispersion and selection of microbial species diversity.

Keywords: bakery, participative research, microbial ecology, lactic acid bacteria, yeasts, microbe domestication, farmers-bakers, bakers, sourdough