



**HAL**  
open science

## Etude des interactions levure-levure en milieu fermentaire

Clément Petitgonnet

► **To cite this version:**

Clément Petitgonnet. Etude des interactions levure-levure en milieu fermentaire. Biotechnologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT : 2019UBFCK019 . tel-02886278

**HAL Id: tel-02886278**

**<https://theses.hal.science/tel-02886278v1>**

Submitted on 1 Jul 2020

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

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



avec le Fonds européen de développement régional (FEDER)

RÉGION  
BOURGOGNE  
FRANCHE  
COMTÉ



UBFC

UNIVERSITÉ  
BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ



ÉCOLE DOCTORALE  
Environnements - Santé  
Bourgogne | Franche-Comté



Université de Bourgogne Franche-Comté  
UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques  
Equipe Vin Aliments Microbiologie et Stress  
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin

## THESE DE DOCTORAT

Spécialité : biotechnologies agro-alimentaires

Présentée par

**Clément PETITGONNET**

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne Franche-Comté

# ETUDE DES INTERACTIONS LEVURE-LEVURE EN MILIEU FERMENTAIRE

Soutenue le 12 avril 2019 devant le jury composé de :

<b>Pr Isabelle MASNEUF-POMAREDE</b>	ISVV, Université de Bordeaux	Rapporteur
<b>Pr Nicolas ROZES</b>	Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili	Rapporteur
<b>Dr Maria Victoria MORENO-ARRIBAS</b>	CIAL, Spanish National Research Council	Examinatrice
<b>Dr Monika COTON</b>	ESIAB, Université de Bretagne Occidentale	Examinatrice
<b>Pr Hervé ALEXANDRE</b>	IUVV, Université de Bourgogne	Directeur de thèse
<b>Dr Géraldine KLEIN</b>	IUVV, Université de Bourgogne	Co-encadrante

## Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier les Pr. Isabelle MASNEUF-POMARED et Nicolas ROZES d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse. Merci également aux Dr. Victoria MORENO-ARRIBAS et Monika COTON d'avoir accepté d'être examinatrices de cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes deux encadrants de thèse, Hervé et Géraldine, pour la liberté qu'ils m'ont laissé dans mon travail, leur disponibilité, leurs conseils, et de manière générale le temps qu'ils ont consacré à cette thèse.

Je voudrais aussi remercier les deux membres de mon comité de suivi de thèse, Delphine SICARD et Nils ARNEBORG, pour le temps qu'ils m'ont consacré lors de ces réunions annuelles et leurs conseils avisés.

Merci au Conseil Régional de Bourgogne (PARI), au FEDER (Fonds Européen de Développement Régional) et au Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation qui ont financé cette thèse.

Je remercie la totalité des membres de l'IUVV, les secrétaires pour leur disponibilité, Christine pour sa compréhension et son aide à chaque demande, l'équipe Vigne pour leur aide avec le microscope à épifluorescence, et évidemment Yamina, pour sa grande patience, son aide précieuse et sa disponibilité à toute épreuve ! Je veux aussi remercier Vaness, pour sa gentillesse, son implication et son aide en toute circonstance !

Un grand merci à l'équipe de doctorants de l'IUVV, Fred, Elissar, Arnaud, Florian, Hany, Peio avec qui ces 3 années ont été un réel plaisir mais aussi les « petits nouveaux », Manon, Fanny et Alexis que j'ai connu en tant que stagiaire pour certains et qui ont bien évolué ! Je remercie également les doctorants/ingénieurs/techniciens de l'UMR PAM que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant ma thèse : Aurore, Emilie, Audrey, Cécile, Adeline et Chloé.

Je voudrais insister sur quelques doctorants, devenus plus que des collègues au cours du temps, avec qui la bonne humeur partagée a été un réel moteur pour avancer dans cette thèse : Rémy, Antoine, et Scott (notre vin était mauvais mais je me souviendrai toujours de cette super soirée pour le fabriquer !). Maxime, Antonio et Edouard, merci pour les soirées jeux et détente passées avec vous !

Merci également à mes différents stagiaires, qui m'ont supporté et eu sur le dos pendant plusieurs mois sans se plaindre !

Je tiens aussi à remercier trois personnes sans qui je n'aurais pas pu accomplir cette thèse : Aurélie RIEU, qui a fait passer ma demande de stage de DSER et donc à Sandrine ROUSSEAUX, qui m'a proposé et accompagné pendant les 6 mois du stage de DSER sur Brett, stage qui m'a donné goût au domaine du vin. Merci de m'avoir accompagné pour le concours de la thèse, et d'avoir été présente pendant la 1<sup>ère</sup> année. Et enfin Cédric LONGIN, un mentor pour moi, ton encadrement pendant le stage de DSER m'a conforté dans l'idée de continuer en thèse. Tu as toujours été franc et honnête avec moi, une vraie qualité de mon point de vue.

Je remercie du fond du cœur mes amis, Nicolas, Cécilia, Pierre, Mathilde et Flavien, Manue, encore merci pour nous avoir prêté votre jardin « au frais » et la piscine pendant la canicule afin d'écrire ma publication.

Merci à ma mère et ma sœur, qui m'ont toujours soutenu et cru en moi, qu'importe mes choix. Je tiens à dédier cette thèse à mon papa, Patrick, qui aurait été fier de pouvoir lire cette thèse et d'assister à ma soutenance, mais que la Grande Faucheuse à emmener trop tôt, je t'aime Papa.

Et pour finir, merci à mon amour, ma meilleure amie, ma confidente, Aurore, devenue mon épouse depuis peu et qui doit me supporter chaque jour, mais qui a toujours su m'encourager et me faire aller de l'avant même dans les moments de doute. Je t'aime Dr. Palud !

# Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Etude bibliographique</b> .....	4
1. De la baie de raisin au vin : notions principales.....	4
1.1. Biodiversité sur la baie de raisin et dans le moût.....	4
1.2. Le rôle des levures dans l'élaboration du vin .....	5
2. Les non- <i>Saccharomyces</i> : intérêts et propriétés œnologiques.....	9
2.1. <i>Starmerella bacillaris</i> .....	9
2.2. <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	11
3. Métabolisme des levures <i>S. cerevisiae</i> et non- <i>Saccharomyces</i> .....	13
3.1. Métabolisme lipidique et réponse au stress.....	13
3.2. Métabolisme oxydatif et réponse au stress .....	17
4. Interactions pendant la fermentation alcoolique .....	19
4.1. Définition des interactions .....	19
4.2. Les interactions levure-levure pendant la fermentation alcoolique .....	20
5. Application de la cytométrie en flux aux microorganismes du vin.....	27
<b>Matériels et méthodes</b> .....	55
1. Souches de levures utilisées .....	55
2. Conditions de culture .....	55
3. Conditions de fermentations.....	55
4. Paramètres du cytomètre en flux .....	57
5. Analyses physiologiques des levures par cytométrie en flux.....	57
6. Suivi des cinétiques fermentaires .....	60
7. Dosage de l'acide L-lactique, de l'oxygène dissout et des acides aminés .....	60
8. Analyse transcriptomique.....	61
9. Dosage des composés volatils .....	62
10. Dosage des acides gras et des phytostérols .....	63
11. Microscopie confocale .....	65
12. Analyse métabolomique par FT-ICR-MS .....	65
13. Analyses statistiques .....	66
<b>Résultats</b> .....	67
1. Suivi physiologique des levures par cytométrie en flux au cours de la fermentation alcoolique.....	68
1.1. Publication scientifique.....	68

1.2. Optimisation du protocole de marquage à l'Iodure de Propidium (IP) .....	95
2. Influence du contact cellule-cellule sur les interactions levure-levure et l'exo- metabolome .....	96
<b>Discussion générale</b> .....	130
<b>Conclusion – Perspectives</b> .....	133
<b>Références</b> .....	136

## Table des illustrations

### Figures

Figure 1 : Diversité des genres levuriens retrouvés sur baie de raisin puis dans le moût. ....	4
Figure 2 : Principales caractéristiques de <i>S. cerevisiae</i> et des levures non- <i>Saccharomyces</i> . ....	5
Figure 3 : Image obtenue par microscopie en champs clair de <i>S. bacillaris</i> .....	9
Figure 4 : Image obtenue par microscopie confocale en champs clair de <i>L. thermotolerans</i> . .	11
Figure 5 : Schéma des voies de synthèse des acides gras, triacylglycérols, esters de stéroles et particules lipidiques.....	15
Figure 6 : Schéma métabolique général de la formation des particules lipidiques chez <i>S. cerevisiae</i> .....	16
Figure 7 : Schéma métabolique général de la production de ROS chez la levure <i>S. cerevisiae</i> . .....	18
Figure 8 : Mécanisme de floculation entre les cellules de <i>S. cerevisiae</i> . ....	26
Figure 9 : Schéma représentant les conditions de fermentations avec le couple <i>L. thermotolerans</i> BBMCZ7-FA20/ <i>S. cerevisiae</i> 59A-GFP .....	57
Figure 10 : Dénombrements des cellules viables de <i>S. cerevisiae</i> 59A-GFP par marquage à l'iodure de propidium (IP, cellules viables = IP négatives) ou sur boîtes de Petri (milieu YPD).....	95

### Tableaux

Tableau 1 : Description des enzymes produites par certaines non- <i>Saccharomyces</i> ainsi que leur production en composés volatils et/ou de métabolites d'intérêts.....	8
Tableau 2 : Présentation des différents types d'interactions avec des exemples pour chacun.	20

## Liste des travaux

### Articles scientifiques :

**Petitgonnet C.**, Longin C., Guilloux-Benatier M., Rousseaux S. & Alexandre H. (2016). "Application of flow cytometry to wine microorganisms". *Food Microbiology*, Volume 62, p. 221–231.

### Communications orales :

**Petitgonnet C.**, Klein G. & Alexandre H. (2018).

« New insights in yeast-yeast interactions during alcoholic fermentation of grape must: a flow cytometry approach ». 24<sup>ème</sup> *Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon (France)*

**Petitgonnet C.**, Klein G. & Alexandre H. (2017).

« Etude des interactions levure-levure pendant la fermentation alcoolique par cytométrie en flux ». 23<sup>ème</sup> *Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon (France)*

**Petitgonnet C.**, Klein G. & Alexandre H. (2018), e-poster.

« New insights in yeast-yeast interactions during alcoholic fermentation of grape must: a flow cytometry approach ». 34<sup>th</sup> *International Specialized Symposium on Yeast (ISSY34), San Carlos de Bariloche (Argentine)*

### Communications affichées :

**Petitgonnet C.**, Klein G. & Alexandre H. (2017).

« Yeast-yeast interaction studies during alcoholic fermentation by flow cytometry ». 33<sup>rd</sup> *International Specialized Symposium on Yeast, Cork (Irlande)*

**Petitgonnet C.**, Klein G. & Alexandre H. (2017).

« Yeast-yeast interaction studies during alcoholic fermentation by flow cytometry ». *Wine Active Compounds 2017, Beaune (France)*

**Petitgonnet C.**, Rousseaux S. & Alexandre H. (2016).

« Etude des interactions levure/levure en milieu fermentaire ». 22<sup>ème</sup> *Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon (France)*

Longin C., **Petitgonnet C.**, Serpaggi V., Maupeu J., Vallet-Courbin A., Rousseaux S., Guilloux-Benatier M. & Alexandre H. (2015). « Interlaboratories comparison of available *Brettanomyces* quantification kits ». *OENO2015, Bordeaux (France)*



## Introduction générale

Le vin est une boisson fermentée élaborée par l'être humain depuis des millénaires. Néanmoins, sa fabrication a été pendant des siècles mal maîtrisée puisque le moût de raisin obtenu après la récolte des grappes (vendanges) était fermenté de manière spontanée par la flore levurienne déjà présente (flore indigène). En 1857, Louis Pasteur met en évidence le procédé de fermentation par les levures, et une levure en particulier fût ensuite tenue pour responsable de ce procédé du fait de sa présence majoritaire, il s'agit de *Saccharomyces cerevisiae*, dont le pouvoir fermentaire est très performant. Suite à cette découverte et au fil des ans, les industriels ont donc naturellement proposé des levains commerciaux pour la fermentation en général, lors de la panification et de la vinification par exemple. En œnologie, des levains composés de souches de *S. cerevisiae* adaptées en fonction de la couleur du vin souhaité (blanc ou rouge) mais aussi présentant des propriétés organoleptiques différentes sont aujourd'hui proposés aux vignerons. L'addition de ces souches commerciales directement dans le moût de raisin a pour but de mieux maîtriser les fermentations afin d'avoir une fermentation alcoolique assez rapide permettant de diminuer le risque de développement de flores d'altérations pouvant entraîner des déviations organoleptiques.

Par la suite, dans les années 1990, d'autres genres levuriens que *S. cerevisiae* ont été isolés sur baie de raisin et/ou dans le moût. Ces levures ont été appelées non-*Saccharomyces*. Ces dernières ont tout d'abord été associées à un impact négatif, entraînant une fermentation languissante ou des défauts organoleptiques dans le produit fini. Mais quelques années plus tard, certaines études ont commencé à démontrer les intérêts de certaines souches de non-*Saccharomyces* au cours de la fermentation. En effet, ces levures sont capables de moduler la complexité aromatique du vin, et ont été proposées plus récemment comme des alternatives au sulfitage (bioprotection) ou encore pour réduire la teneur en alcool de certains vins. Ainsi, l'intérêt pour les levures non-*Saccharomyces* s'est amplifié ces dernières années et de nombreuses études s'intéressent aux associations possibles entre *S. cerevisiae* et les non-*Saccharomyces* dans le but d'apporter de nouvelles innovations à la filière viti-vinicole. Mais cette association présente certains problèmes dûs aux interactions pouvant exister entre les espèces présentes. Ces interactions sont souvent négatives pour les levures non-*Saccharomyces*, avec une mort précoce en début de fermentation ou une perte de la production de molécules aromatiques intéressantes, mais aussi parfois pour *S. cerevisiae* avec des fermentations plus longues, voire des déviations organoleptiques. Ainsi, que cela soit avec l'utilisation de ferments mixtes *S. cerevisiae* / non-*Saccharomyces* ou bien la flore indigène, il apparaît nécessaire de

mieux comprendre les interactions entre ces espèces levuriennes pour mieux contrôler leur utilisation. Pour cela, différentes approches ont souvent été utilisées, en comparant des fermentations pures de chaque espèce avec des fermentations mixtes ou séquentielles avec les deux espèces. Par exemple, pour chaque condition, la production des composés volatils peut être analysée de même que l'étude du contact cellule-cellule en ajoutant une séparation physique entre les deux espèces. Cependant, peu de choses sont décrites dans la littérature concernant la physiologie des levures au cours de la fermentation alcoolique.

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier les interactions *S. cerevisiae* / non-*Saccharomyces* au cours de la fermentation alcoolique par le développement d'outils permettant leur analyse, afin de mieux comprendre ces interactions et donc d'optimiser l'utilisation des levures non-*Saccharomyces* en vinification. Ainsi, cette étude se compose de 3 axes principaux :

- Mise en place d'une méthode de discrimination *S. cerevisiae* / non-*Saccharomyces* et de suivi physiologique des levures au cours de la fermentation par cytométrie en flux.
- Application de la méthode établie avec des suivis physiologiques de *S. cerevisiae* et certaines non-*Saccharomyces* au cours de fermentations alcooliques en jus de raisin ou moût réel.
- Etude des interactions *S. cerevisiae* / non-*Saccharomyces* avec différentes techniques d'analyse complémentaire à la cytométrie en flux dont l'analyse de l'exo-métabolome de fermentations pures et séquentielles par spectrométrie de masse.

La première partie se concentre sur l'étude bibliographique, en présentant les connaissances actuelles sur l'utilisation des levures *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces* pour l'élaboration du vin, de leurs propriétés œnologiques à leur métabolisme propre à chacune. Les connaissances sur les interactions déjà rapportées entre ces espèces au cours de la fermentation alcoolique sont aussi présentées dans cette partie avec les méthodes utilisées et les résultats en découlant. A la fin de cette partie, un focus est fait sur la cytométrie en flux, son utilisation pour étudier la physiologie des microorganismes du vin au cours de la fermentation ainsi que son intérêt pour étudier les interactions entre *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces*.

La deuxième partie aborde les différentes techniques et méthodes utilisées ou mises au point, ainsi que les souches de levures utilisées pendant cette thèse.

La troisième partie présente les résultats obtenus, avec en chapitre un la stratégie choisie pour discriminer les levures *S. cerevisiae* des levures non-*Saccharomyces* au cours de la fermentation alcoolique par cytométrie en flux. La mise en place d'un protocole de suivi physiologique des levures est aussi proposée dans ce chapitre, avec la sélection de fluorochromes spécifiques d'une fonction donnée comme le stress oxydatif ou la viabilité.

Le deuxième chapitre de cette partie présente les résultats issus de suivis de fermentations alcooliques en jus de raisin ou moût réel, avec une analyse quotidienne de la physiologie des levures par cytométrie en flux grâce au protocole mis en place. Des premiers indices sur la nature des interactions entre *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces* sont mis en évidence dans cette partie.

Le troisième et dernier chapitre de cette partie présente les résultats obtenus lors de l'étude des interactions entre *S. cerevisiae* et *L. thermotolerans* avec des fermentations séquentielles avec ou sans contact cellule-cellule. Plusieurs analyses de ces fermentations sont détaillées dans ce chapitre, notamment le dosage de nutriments, l'analyse des composés volatils présents en fin de fermentation ainsi qu'une approche métabolomique.

Cette thèse se termine ensuite par une conclusion générale des résultats obtenus ouvrant sur des perspectives concernant l'étude des interactions *S. cerevisiae* / non-*Saccharomyces* au cours de la fermentation alcoolique.

## Etude bibliographique

### 1. De la baie de raisin au vin : notions principales

L'élaboration du vin passe par une succession d'étape, qui débute par la vendange des grappes de raisins. L'une des étapes clés de ce procédé de fabrication est la fermentation alcoolique qui se traduit par la transformation des sucres présents dans le moût de raisin en éthanol, avec dégagement de dioxyde de carbone. Cette étape a lieu grâce à l'intervention des levures, présentes naturellement sur la baie de raisin, dans le moût ainsi que dans la cuverie et le matériel.

#### 1.1. Biodiversité sur la baie de raisin et dans le moût

Au moment des vendanges, c'est-à-dire quand le raisin est à maturité, la quantité de levures retrouvées sur les baies varie de  $10^3$  à  $10^6$  UFC/g de baie avec une forte diversité de genre (Fleet et al., 2002). En effet, des genres comme *Cryptococcus*, *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, ou encore *Kluyveromyces* sont présents majoritairement sur les baies mures, représentant la flore de levures dites non-*Saccharomyces* alors que l'espèce fermentaire de référence *S. cerevisiae* est très peu retrouvée sur baie (Figure 1) (Fleet, 2003; Grangeteau, 2016; Jolly et al., 2006; Mortimer and Polsinelli, 1999; Prakitchaiwattana et al., 2004; Renouf et al., 2005).

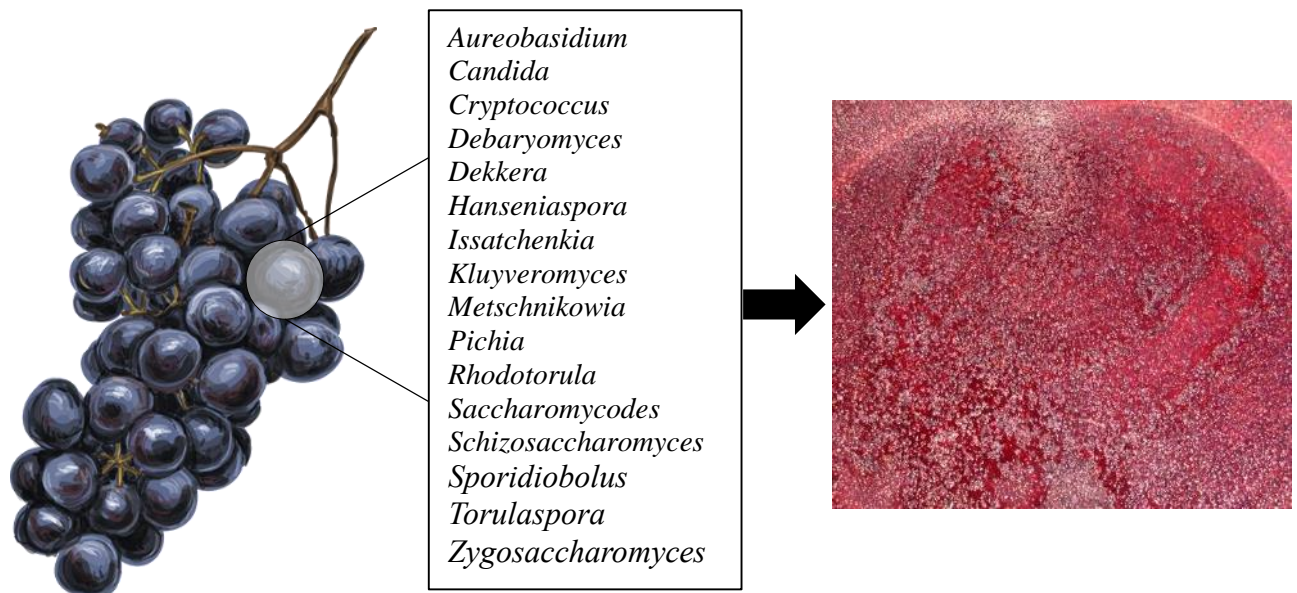


Figure 1 : Diversité des genres levuriens retrouvés sur baie de raisin puis dans le moût. D'après Grangeteau, 2016.

Cependant, la diversité des genres ainsi que la quantité de levure varie fortement en fonction de plusieurs paramètres comme le cépage, le traitement phytosanitaire, ou encore le climat mais toujours avec une faible proportion de *S. cerevisiae* (Jolly et al., 2006; Sadoudi, 2014). L'environnement du chai et de la cave joue aussi sur la diversité levurienne avec une persistance

des levures, et surtout de *S. cerevisiae*, d'une année à l'autre sur l'équipement, les sols ou les murs (Bokulich et al., 2013; Fleet and Heard, 1993; Grangeteau, 2016; Mortimer and Polsinelli, 1999).

Ainsi, la plupart de ces espèces de levures vont se retrouver dans le moût de raisin et ce sont souvent les levures non-*Saccharomyces* qui débutent la fermentation alcoolique puisqu'elles sont en nombre plus important que *S. cerevisiae* à ce stade (Fleet, 2003; Jolly et al., 2003, 2006; Mora et al., 1990). Par la suite, *S. cerevisiae* va se développer dans le moût et devenir l'espèce majoritaire au détriment des non-*Saccharomyces* pour finir la fermentation alcoolique.

### 1.2. Le rôle des levures dans l'élaboration du vin

La dominance de *S. cerevisiae* au cours de la fermentation alcoolique est en partie due à sa capacité de survivre aux conditions drastiques du moût en fermentation, c'est-à-dire un pH acide compris entre 3,0 et 3,5, une teneur faible en oxygène, la présence d'éthanol au-delà de 12 % (v/v) ou encore des températures défavorables mais aussi aux sulfites ajoutés dans le moût lors de la vinification (Engle and Fay, 2012; Williams et al., 2015). La tolérance à ces conditions physico-chimiques défavorables est souvent absente ou plus faible chez les non-*Saccharomyces* (Figure 2) (Alexandre et al., 1994; Bauer and Pretorius, 2000; Ding et al., 2009).

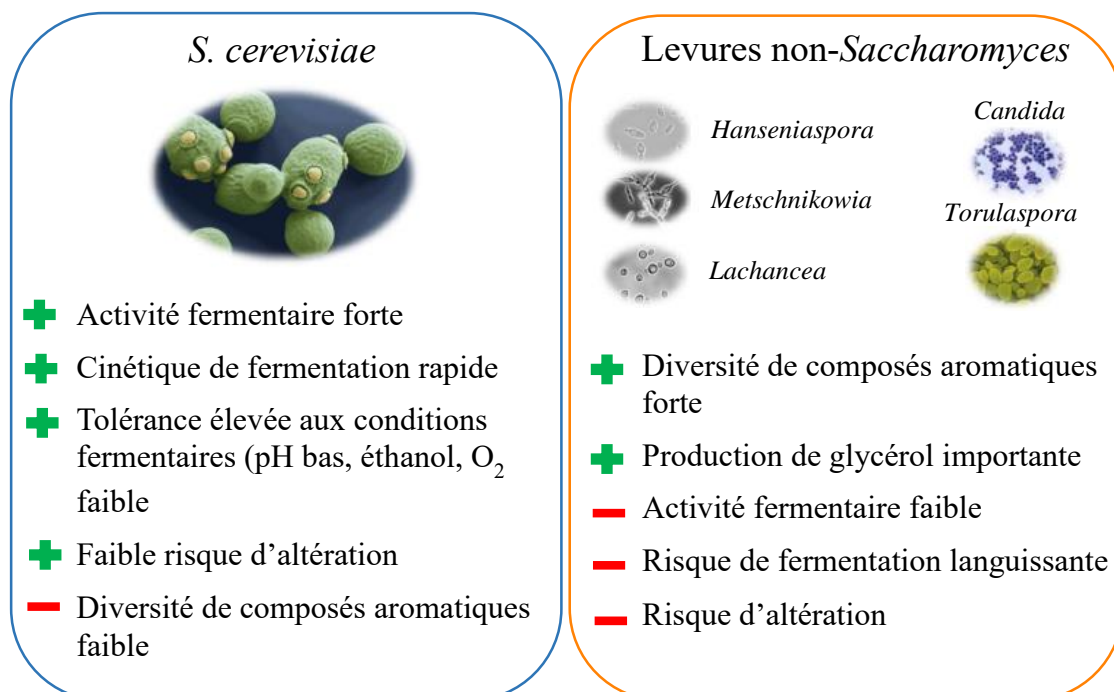


Figure 2 : Principales caractéristiques de *S. cerevisiae* et des levures non-*Saccharomyces*.  
D'après Albergaria et Arneborg, 2016.

*S. cerevisiae* est donc la candidate favorite pour assurer une fermentation alcoolique rapide et complète, c'est-à-dire une fermentation sans sucres résiduels et accomplie en quelques jours. Cependant, les non-*Saccharomyces* qui sont aussi présentes dans le moût peuvent jouer un rôle important dans la fermentation, notamment dans la modulation de la complexité aromatique du produit fini, le vin. La complexité aromatique est un terme large, sujet à controverse, recoupant plusieurs facteurs, comme la pratique de viticulture, le cépage, la pratique œnologique et bien sûr les microorganismes (Tempère et al., 2018). Les levures non-*Saccharomyces* participent donc à la complexité aromatique du vin, notamment parce qu'elles sont capables de produire certaines enzymes absentes ou faiblement exprimées chez *S. cerevisiae* (Tableau 1) (Charoenchai et al., 1997; Strauss et al., 2001). Parmi ces enzymes, des pectinases permettant la dégradation de la pellicule de la baie de raisin, des protéases améliorant la clarification du moût et surtout des  $\beta$ -glycosidases sont retrouvées. En effet, beaucoup de composés aromatiques des baies sont sous formes glycosylés appelés précurseurs et donc sans saveur. Ces précurseurs vont ainsi être hydrolysés par les  $\beta$ -glycosidases pour libérer les composés aromatiques volatils et donc améliorer la complexité aromatique du vin (Fleet, 2008; Jolly et al., 2014). Une famille de composé aromatique importante est directement concernée par ce phénomène : les terpènes, et plus particulièrement les terpénols qui sont volatils s'ils ne sont pas conjugués à une autre molécule. Une autre famille de composés aromatiques est impactée par l'action des non-*Saccharomyces* : les thiols volatils apportant des notes fruitées au vin. Ces molécules peuvent être libérées en présence de *S. cerevisiae* mais leur concentration et leur diversité augmentent fortement en présence de non-*Saccharomyces* (Garcia et al., 2002; Jolly et al., 2014; Sadoudi et al., 2012). Ainsi, la présence des levures non-*Saccharomyces* a un impact direct sur la diversité des composés volatils retrouvés dans le vin après la fermentation alcoolique. L'étude d'Albertin et al. (2017) a montré que l'utilisation d'une souche de *S. cerevisiae* avec une longue phase de latence permettait un développement plus important d'un mélange de cinq non-*Saccharomyces* (*M. pulcherrima*, *S. bacillaris*, *P. kluyveri*, *H. uvarum* et *T. delbrueckii*) mais semblait aussi moduler les caractères doux et fruités du vin fermenté de cette manière. Une augmentation d'esters volatils a été reporté par Renault et al. (2015) en utilisant une souche de *T. delbrueckii* en fermentation mixte ou séquentielle avec *S. cerevisiae*, obtenant alors des vins plus fruités, avec des compositions en esters différentes en fonction du type de fermentation. Ces auteurs ont ainsi montré une interaction positive entre les deux espèces d'un point de vue composés volatils, malgré une chute de viabilité pour *T. delbrueckii* en fermentation mixte par rapport à la fermentation séquentielle. Une autre molécule, le glycérol, joue un rôle important dans la sensation en bouche ainsi que dans la complexité du

vin et peut être impacté avec parfois une forte augmentation de sa concentration en présence de certaines non-*Saccharomyces*.

Cependant, un paramètre important qui ressort des études menées sur la complexité aromatique des vins est l'effet souche dépendant. L'activité enzymatique et la transformation de précurseurs en molécules aromatiques va dépendre fortement des espèces mais surtout des souches de non-*Saccharomyces* présentes dans le moût (Jolly et al., 2014; Wang et al., 2016).

Tableau 1 : Description des enzymes produites par certaines non-*Saccharomyces* ainsi que leur production en composés volatils et/ou de métabolites d'intérêts. D'après García et al. (2016) ; Jolly et al. (2006) ; Padilla et al. (2016).

Espèces	Production d'enzymes	Production de composés volatils et/ou métabolites
<i>Starmerella bacillaris</i>	Carbon-sulfur lyase	Alcools supérieurs Esters Composés soufrés
<i>Lachancea thermotolerans</i>	$\beta$ -D-glucosidase Carbon-sulfur lyase Pectinase	Glycérol Acide L-lactique 2-phényléthanol Alcools supérieurs Esters
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	$\beta$ -D-glucosidase Carbon-sulfur lyase Lipase	Linalool Acide succinique Esters Composés soufrés
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	$\beta$ -D-glucosidase Carbon-sulfur lyase $\beta$ -D-xylosidase Pectinase Protéase Amylase Lipase	Alcools supérieurs
Mélange d'espèces	Type d'inoculation	Impact sur le vin
<i>S. bacillaris</i> / <i>S. cerevisiae</i>	Co-inoculation et séquentielle	Augmentation 3-mercapto-hexanol (3-MH) Diminution acide acétique
<i>L. thermotolerans</i> / <i>S. cerevisiae</i>	Co-inoculation et séquentielle	Augmentation acidité totale
<i>T. delbrueckii</i> / <i>S. cerevisiae</i>	Co-inoculation et séquentielle	Augmentation $\alpha$ -terpinéol et linalool Diminution acide acétique Augmentation alcools supérieurs, esters d'éthyle et d'acétate
<i>M. pulcherrima</i> / <i>S. cerevisiae</i>	Co-inoculation et séquentielle	Augmentation $\alpha$ -terpinéol Diminution acide acétique Augmentation esters d'éthyle



## 2. Les non-Saccharomyces : intérêts et propriétés œnologiques

Les levures non-*Saccharomyces* présentent de nombreux intérêts d'un point de vue organoleptique comme vu précédemment. Mais leur utilisation ne s'arrête pas là, puisque de plus en plus d'études s'intéressent à elles pour d'autres propriétés, comme la réduction de la teneur en alcool des vins ou encore la bioprotection, qui serait une alternative à l'utilisation de sulfites dans les vins, technique très controversée de nos jours (Gonzalez et al., 2013; Morales et al., 2015; Simonin et al., 2018). Lors des travaux de thèse, deux levures non-*Saccharomyces* ont été choisies pour leur intérêt œnologique d'après des études précédentes réalisées dans le laboratoire (Sadoudi, 2014; Sadoudi et al., 2012). En effet, des interactions négatives ont été mises en évidence dans ces travaux entre *S. bacillaris* et *S. cerevisiae* (production de composés volatils modifiée) ainsi qu'entre *L. thermotolerans* et *S. cerevisiae* (chute de viabilité de la non-*Saccharomyces* en milieu/fin de fermentation alcoolique).

### 2.1. *Starmerella bacillaris*

*Starmerella bacillaris*, anciennement appelée *Candida zemplinina*, est une levure non-*Saccharomyces* caractérisée pour la première fois sur des baies de raisins et du moût affectés par le champignon *Botrytis cinerea* (Mills et al., 2002; Sipiczki, 2003). Elle se présente sous forme d'ellipsoïdes allongés au microscope (2,2–3,0 x 3,0–5,2 µm) et a été décrite comme résistante aux températures basses (psychrotolérante, jusqu'à 10 °C) mais aussi osmotolérante (concentration en glucose jusqu'à 600 g.L<sup>-1</sup>) ce qui lui permet de survivre sans difficulté dans le moût surtout avec de fortes teneurs en sucres (Englezos et al., 2018a; Magyar and Tóth, 2011; Sipiczki, 2003; Zott et al., 2008). La diversité génétique de cette levure non-*Saccharomyces* est forte en milieux œnologiques, diversité ainsi dépendante de la localisation géographique de la souche (Masneuf-Pomarede et al., 2015).



Figure 3 : Image obtenue par microscopie en champs clair de *S. bacillaris*.

En moût, *S. bacillaris* est donc capable d'initier une fermentation alcoolique même à basse température et à fort taux de glucose, avec une particularité propre à cette espèce : la consommation prioritaire du fructose. En effet, ce caractère fructophile est retrouvé chez la plupart des souches de *S. bacillaris* comme a pu le montrer Englezos et al. (2015) avec 63 souches testées. Ainsi, lors de fermentations alcooliques en moût, *S. bacillaris* va d'abord consommer le fructose en 20 à 30 jours suivant la teneur en sucres et parfois, en fonction des souches, commencer à consommer le glucose plus ou moins rapidement. Cependant, son rendement fermentaire est plus faible que celui de *S. cerevisiae* puisqu'il peut atteindre environ 41 g de sucres (glucose ou fructose) pour former 1 % (v/v) d'éthanol, contre environ 17 g pour *S. cerevisiae* en moyenne (Englezos et al., 2015; Magyar and Tóth, 2011). Dans l'étude d'Englezos et al. (2015), les auteurs ont aussi montré une activité enzymatique de type  $\beta$ -glucosidase et ester-hydrolase chez certaines souches mais aussi une activité protéase dans la plupart des souches testées. Ils ont aussi montré une bonne capacité à résister à des fortes teneurs en éthanol allant jusqu'à 14 % (v/v) pour certaines souches ainsi qu'à des teneurs en  $\text{SO}_2$  atteignant jusqu'à 50 mg/L pour la plupart des souches. Concernant les molécules produites au cours de la fermentation, *S. bacillaris* produit du glycérol en concentration similaire à *S. cerevisiae* seule (8-10 g.L<sup>-1</sup>), et une fermentation séquentielle avec ces deux espèces augmente la production de glycérol (jusqu'à 15 g.L<sup>-1</sup>) (Englezos et al., 2016, 2015; Magyar and Tóth, 2011; Rantsiou et al., 2012; Tofalo et al., 2012). De plus, *S. bacillaris* est plutôt qualifiée de faible productrice d'acide acétique, un composé non désiré dans le vin, et une co-fermentation avec *S. cerevisiae* présente une teneur plus faible comparée à une fermentation avec *S. cerevisiae* seule (Rantsiou et al., 2012; Sadoudi, 2014; Sadoudi et al., 2012; Tofalo et al., 2012). Toutes ces caractéristiques ont fait de *S. bacillaris* une candidate de choix pour l'étude de fermentations mixtes avec *S. cerevisiae* pour améliorer la complexité du vin. En effet, outre sa forte production de glycérol, *S. bacillaris* est aussi capable de produire des molécules aromatiques intéressantes d'un point de vue œnologique. Dans une étude de Sadoudi et al. (2012), les composés volatils produits par *S. bacillaris* ont été quantifiés et révèlent la présence de lactone, de norisoprenoïdes et de terpénols en quantité importante, ces composés étant caractérisés comme apportant des notes fruitées et florales au vin. L'étude d'Englezos et al. (2016) montre aussi une production plus importante de composés volatils augmentant la complexité aromatique du vin, notamment au niveau des esters volatils. De même, l'étude de Anfang et al. (2009) a montré que *S. bacillaris* produisait de fortes concentrations de 3-MH et de 3 mercapto-hexyle acetate (3-MHA), deux thiols aromatiques apportant des notes de fruits

exotiques, tropicaux ou encore d'agrumes pouvant donc impacter fortement la complexité aromatique du vin.

Cependant, les études de Englezos et al. (2016) et Sadoudi et al. (2012) présentent des différences importantes. En effet, pour la première, une co-fermentation de *S. bacillaris* avec *S. cerevisiae* augmente la complexité aromatique par la production de composés volatils en quantité plus importante que pour *S. cerevisiae* seule alors que pour la deuxième, les composés volatils spécifiques de *S. bacillaris* ne sont plus produits dans la co-fermentation avec *S. cerevisiae*. Cette différence montre la variabilité forte qu'il peut exister entre les études existantes, puisque les auteurs n'utilisent pas la même souche de *S. bacillaris*, de *S. cerevisiae* et surtout des moûts provenant de cépages différents.

## 2.2. *Lachancea thermotolerans*

*Lachancea thermotolerans*, anciennement appelée *Kluyveromyces thermotolerans*, est une levure isolée pour la première fois dans de la confiture de prune en 1932 mais est plutôt considérée maintenant comme une espèce ubiquitaire puisque retrouvée chez les insectes, les plantes, le sol, les cultures horticoles et en particulier les baies de raisin (Hranilovic et al., 2017; Kurtzman et al., 2011). Elle se présente sous forme sphérique, ovoïde ou allongée, et possède la particularité de produire des concentrations importantes d'acide L-lactique (Hranilovic et al., 2017; Kurtzman, 2003).

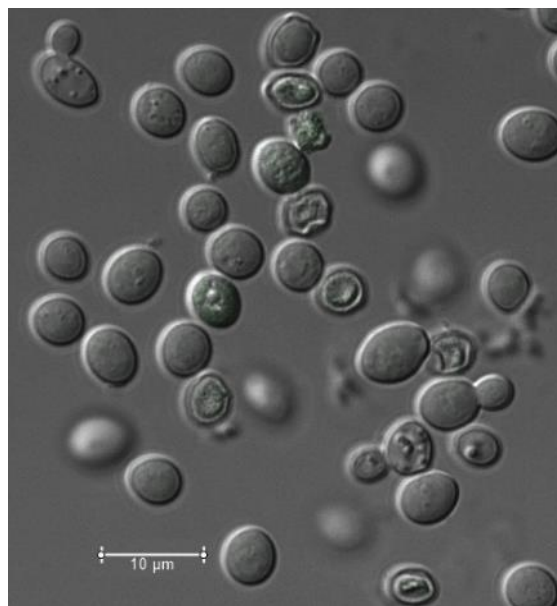


Figure 4 : Image obtenue par microscopie confocale en champs clair de *L. thermotolerans*.

Cette levure non-*Saccharomyces* a été retrouvée naturellement dans des moûts provenant de cépages et/ou de régions assez différentes, de l'Espagne à l'Italie en passant par la France, ou même en Turquie et en Argentine, montrant bien son caractère ubiquitaire (Balikci et al., 2016; Kapsopoulou et al., 2005; Mora et al., 1990; Pardo et al., 1989; Sadoudi, 2014; Sangorrín et al., 2001; Torija et al., 2001). La plupart de ces auteurs ont utilisé *L. thermotolerans* en association avec *S. cerevisiae* pour la fermentation des moûts. Ces fermentations mixtes présentent des avantages intéressants pour le produit fini et spécifiques de l'utilisation de *L. thermotolerans*, comme la faible production d'acidité volatile (via une faible production d'acide acétique), l'absence de composés aromatiques indésirables, un faible rendement en éthanol et une forte production d'acide L-lactique permettant d'augmenter l'acidité totale des vins (Gobbi et al., 2013). Cette production d'acide L-lactique est le trait caractéristique de *L. thermotolerans*, reporté par toutes les études portant sur cette levure non-*Saccharomyces*. Cette particularité est intéressante pour les moûts présentant une faible acidité totale, comme c'est le cas dans certaines régions, qui va ainsi pouvoir être augmentée par l'action de *L. thermotolerans* et la production de cet acide (Balikci et al., 2016; Comitini et al., 2011; Gobbi et al., 2013; Jolly et al., 2014; Kapsopoulou et al., 2006; Mora et al., 1990).

De plus, *L. thermotolerans* est capable de se maintenir pendant la fermentation alcoolique, de manière hétérogène en fonction des souches, certaines jusqu'à des teneurs en alcool avoisinant les 9 % (v/v), après quoi leur persistance dans le moût faiblit fortement au profit de *S. cerevisiae* (Kapsopoulou et al., 2005) mais d'autres souches se maintiennent jusqu'à des teneurs en alcool de 13 % (v/v) (Ciani et al., 2006).

Outre ces différentes caractéristiques, *L. thermotolerans* est aussi intéressante par sa production de certains composés aromatiques. En effet, une étude de Beckner Whitener et al. (2015) s'est intéressée aux composés volatils produits par *L. thermotolerans* en fermentation seule de Syrah ou Sauvignon blanc avant l'ajout de *S. cerevisiae*. Ces auteurs ont ainsi montré l'augmentation de la concentration de certains composés volatils comme le 2-méthyle-1-propanol, un alcool supérieur, apportant des notes fruitées, l'éthyle phenacétate, un ester, pour des notes florales ou encore le nérol, un terpène, pour des notes de citron. De même, Zott et al. (2011) ont mis en évidence l'action positive de *L. thermotolerans* dans du Sauvignon blanc par la libération de deux thiols volatils présents à partir de leur précurseur (conjugué à la cystéine) par l'action d'enzyme carbone-sulfure lyase (Belda et al., 2017; Padilla et al., 2016). Ces deux thiols volatils sont le 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4-MSP) et le 3-MH apportant des notes fruitées au vin, très recherchées. De plus, *L. thermotolerans* est reconnue pour augmenter aussi la

concentration en glycérol dans le vin, ce qui augmente la sensation en bouche et la complexité du produit (Benito et al., 2015; Comitini et al., 2011; Jolly et al., 2014).

### 3. Métabolisme des levures *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces*

Au cours de la fermentation alcoolique, les changements physico-chimiques du moût tels que l'augmentation du pourcentage d'éthanol, la diminution de la disponibilité en oxygène, la diminution du pH ainsi que l'éventuelle addition de SO<sub>2</sub> vont fortement impacter le métabolisme des levures présentes (Ciani et al., 2010; Heard and Fleet, 1988; Holm Hansen et al., 2001; Salmon et al., 1998). De plus, la compétition pour les nutriments présents dans le moût entre les différentes espèces de levures peut aussi entraîner des modifications métaboliques pour améliorer la survie des cellules. Dans cette optique, nous nous sommes principalement intéressés à deux voies métaboliques chez les levures *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces* à savoir les métabolismes lipidique et oxydatif et les réponses associées à une perturbation ou un manque de substrat dans ces voies (stress). Les métabolismes lipidique et oxydatif ont été principalement décrit chez *S. cerevisiae* même si depuis quelques années, certaines études se concentrent sur les non-*Saccharomyces* (Aguilera et al., 2006; Mendes-Ferreira et al., 2010; Pina et al., 2004).

#### 3.1. Métabolisme lipidique et réponse au stress

Les acides gras sont des composés essentiels à la vie des levures puisqu'ils font partie intégrante de la bicouche lipidique de la membrane, mais aussi pour leur capacité à produire de l'énergie à la cellule par leur dégradation via la  $\beta$ -oxydation. Les acides gras cellulaires peuvent provenir de trois sources différentes : le milieu extérieur, le renouvellement des lipides et la synthèse *de novo* couplée à l'élongation (Tehlivets et al., 2007). La synthèse *de novo* des acides gras a lieu essentiellement dans le cytoplasme des levures en utilisant principalement de l'acétyl-CoA provenant de la glycolyse et de la voie du pyruvate-acétaldéhyde-acétate (Beopoulos et al., 2011). Dans un premier temps, l'acétyl-CoA est carboxylé par l'addition d'une molécule de CO<sub>2</sub> pour former du malonyl-CoA grâce à l'acétyl-CoA carboxylase. Ensuite, plusieurs étapes d'élongation à partir du malonyl-CoA se font par incorporation d'acétyl-CoA, formant un acyl-CoA, sous l'action d'un complexe enzymatique spécifique (Fatty Acid Synthase, FAS) qui utilise le NADPH comme co-facteur. Cette élongation se termine généralement par des acides gras avec 14 à 16 carbones selon les espèces, en majorité monoinsaturés. L'insaturation a lieu dans le réticulum endoplasmique et est catalysée par des désaturases, oxygène dépendantes, avec principalement deux identifiées chez *S. cerevisiae* (Beopoulos et al., 2011) :

- Une  $\Delta 9$ -fatty acid desaturase permettant l'insertion d'une double liaison à partir d'un acide gras saturé (C16:0 et C18:0) pour former les acides palmitoléiques (C16:1) et oléiques (C18:1)
- Une  $\Delta 12$ -fatty acid desaturase catalysant l'insertion d'une deuxième double liaison entre les carbones 12 et 13 de l'acide oléique pour former l'acide linoléique (C18:2).

Il est aussi possible pour la levure de produire des acides gras possédant de 20 à 26 carbones, avec des réactions similaires mais ayant lieu dans le réticulum endoplasmique (Tehlivets et al., 2007). Dans un milieu contenant des acides gras, les levures sont aussi capables d'assimiler ces acides gras par la voie *ex novo*.

Une autre famille de lipide est fortement impliquée dans la formation de la membrane des levures : les stérols, et plus particulièrement l'ergostérol. Sa synthèse *de novo* commence aussi avec de l'acétyl-CoA, qui subit une succession de réaction pour former l'ergostérol (Czabany et al., 2007). Les acides gras, qu'ils soient synthétisés ou récupérés dans le milieu, sont en majorité transformés en triacylglycérols (TAG) tandis que les stérols sont transformés en esters de stérol (SE) puis stockés sous forme de « cœur hydrophobe » appelé particule/corps/gouttelette lipidique, pour une utilisation future par la levure (Czabany et al., 2007; Tehlivets et al., 2007). Chez *S. cerevisiae*, les TAG sont stockés au centre de ces particules lipidiques (PL), entourés de « coques » composées des esters de stérols, elles-mêmes entourées d'une monocouche de phospholipides avec des protéines ancrées dedans (Koch et al., 2014). Lors d'un manque en nutriments, l'hydrolyse de ces particules lipidiques par les TAG lipases localisées à la surface des PL permet de libérer des acides gras qui vont être utilisés par la levure pour construire sa membrane et/ou produire de l'énergie. Du diacylglycérol (DAG) est aussi libéré lors de l'hydrolyse, qui est un précurseur de la synthèse de phosphatidyléthanolamine et phosphatidylcholine via la voie Kennedy, mais aussi un second messenger pour la transmission du signal (Czabany et al., 2007; Koch et al., 2014). L'hydrolyse des PL fait aussi intervenir des esters de stérol hydrolases qui vont permettre la libération des esters de stérol pouvant, après transformation en ergostérol, intégrer ou être incorporés dans la double couche de la membrane plasmique pour réguler sa stabilité.

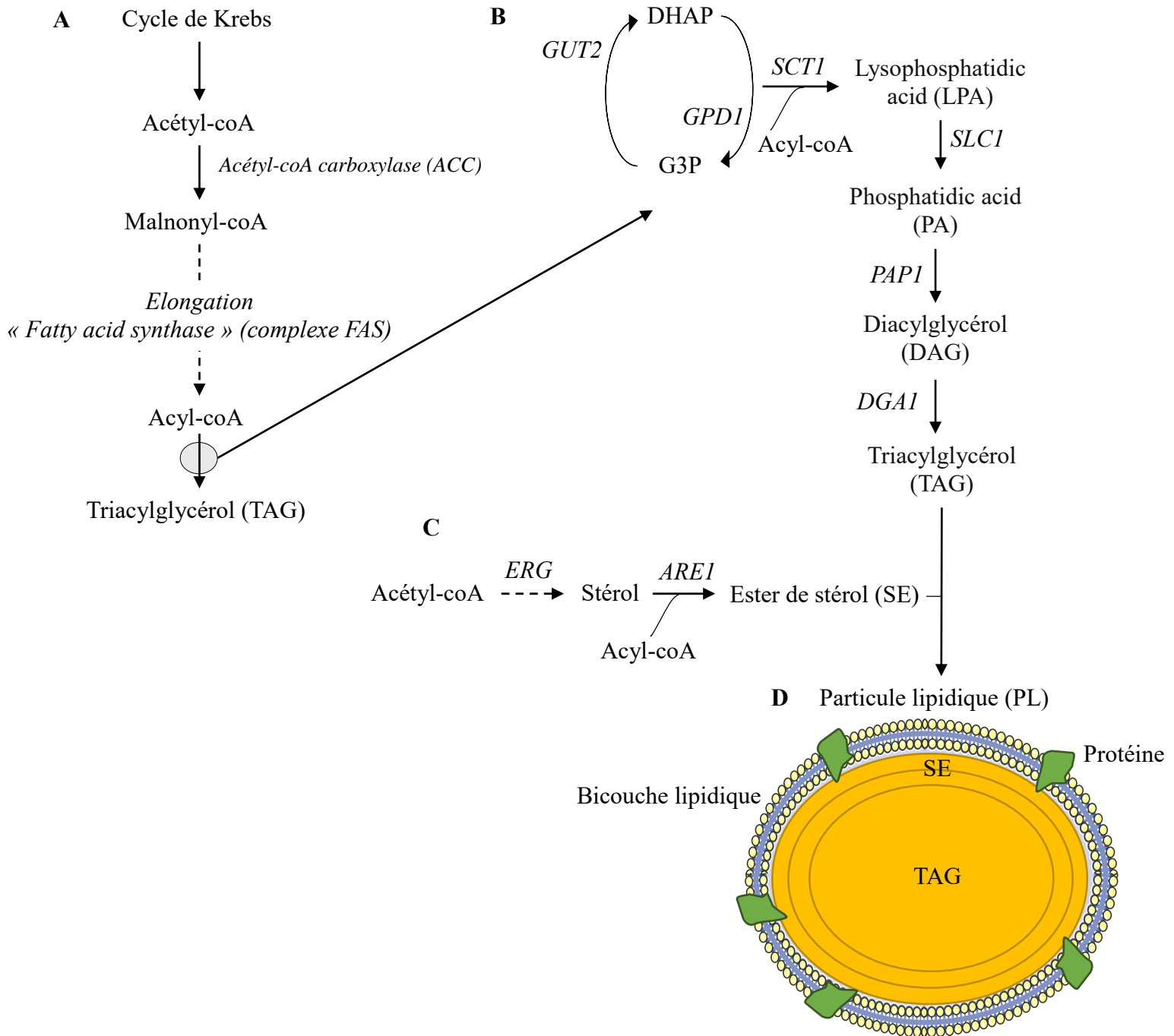


Figure 5 : Schéma des voies de synthèse des acides gras, triacylglycérols, esters de stérols et particules lipidiques. (A) Voie de synthèse *de novo* simplifiée des acides gras et de leur élévation chez les levures. (B) voie de synthèse du triacylglycérol (TAG). (C) voie de synthèse des esters de stérols (SE). (D) particule lipidique formée à partir de TAG et de SE. D'après Beopoulos et al., 2011 ; Tehlivets et al., 2007 ; Czabany et al., 2007 ; Koch et al., 2014

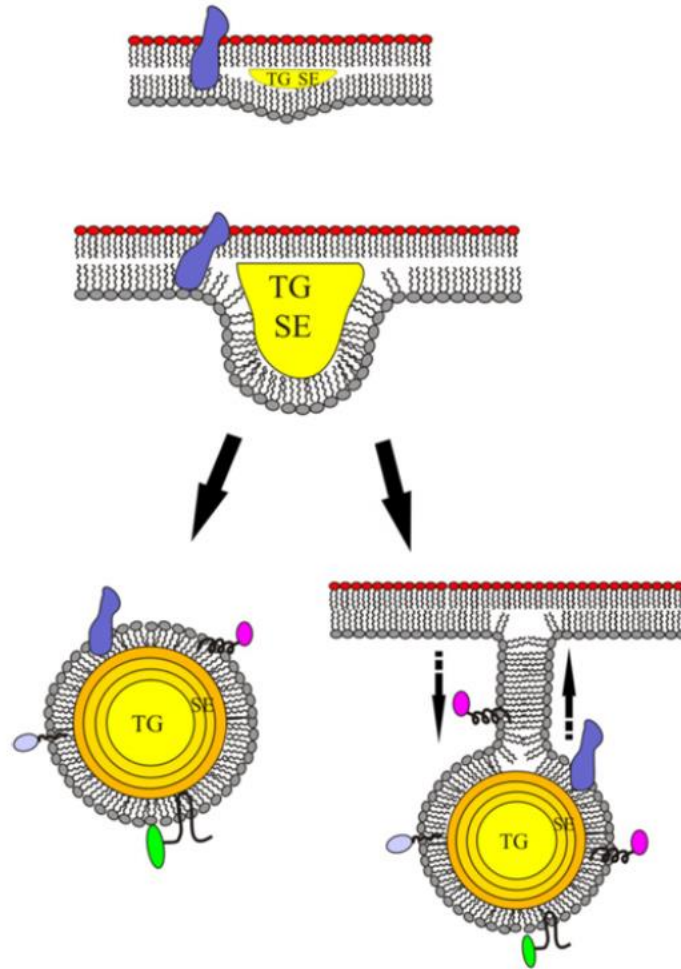


Figure 6 : Schéma métabolique général de la formation des particules lipidiques chez *S. cerevisiae*.  
 TG : Triacylglycérol ; SE : ester de stérol. D'après Koch, 2014.

Cependant, la synthèse *de novo* des acides gras insaturés et des stérols requiert la présence d'oxygène pour que les enzymes impliquées soient actives (Deytieux et al., 2005; Salmon et al., 1998). En effet, le manque d'oxygène affecte particulièrement la  $\Delta^9$ -fatty acid desaturase ainsi que la squalène époxydase, deux enzymes oxygène-dépendantes nécessaires à la biosynthèse des acides gras insaturés et de l'ergostérol respectivement (Mannazzu et al., 2008). Cela peut entraîner une quantité excédentaire d'acides gras saturés dans la cellule ainsi que de précurseurs de l'ergostérol, qui peuvent alors s'accumuler sous forme de PL. Ainsi, en l'absence d'oxygène comme c'est le cas pendant la fermentation alcoolique, les levures vont devoir assimiler les stérols et les acides gras nécessaires à leur survie directement depuis le milieu extérieur : le moût de raisin (Beltran et al., 2008; Pina et al., 2004; Salmon, 2006; Torija et al., 2003). Ce dernier est principalement constitué d'acide gras insaturés (Castela et al., 1985) et de trois phytostérols : le  $\beta$ -sitostérol (environ 90 %), le stigmastérol (environ 5 %) et le campestérol (environ 5 %)(Le Fur et al., 1994; Luparia et al., 2004). Ainsi, les levures en anaérobiose vont assimiler ces phytostérols comme substituant de l'ergostérol, ce qui va dans un premier temps



leur permettre de croître correctement et d'avoir un pouvoir fermentaire fort (Luparia et al., 2004; Salmon, 2006). Cependant, si aucun apport d'oxygène n'est fait, les phytostérols vont devenir les stérols majoritaires dans la membrane et perturber ses propriétés, cela pouvant conduire à des fermentations languissantes et une perte de viabilité des levures. De plus, l'anaérobiose pendant la fermentation ainsi que le fort taux de sucres du moût inhibent la chaîne respiratoire et cela conduit à l'incapacité des cellules à former des acides gras insaturés (Salmon, 2006; Salmon et al., 1998). Ainsi, les cellules peuvent se retrouver avec un excès en acides gras saturés et en précurseurs de stérols, qui peuvent alors être stockés dans les PL avant dégradation traduisant un rôle important des PL pour la détoxification des lipides en cas de stress, qui peuvent alors s'accumuler plus que d'ordinaire (Mannazzu et al., 2008; Müllner and Daum, 2004).

### 3.2. Métabolisme oxydatif et réponse au stress

L'oxygène est une molécule fortement présente dans l'environnement des levures vivant en aérobiose. Cette molécule fait partie intégrante de la chaîne respiratoire (accepteur final d'électron) présente dans les mitochondries des cellules menant à la production d'énergie sous forme d'ATP (Rosenfeld and Beauvoit, 2003; Slater, 1972). Cependant, un électron issu de la chaîne respiratoire peut réagir avec l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxyde qui va être pris en charge par des superoxydes dismutases (SOD) pour détoxifier la cellule en formant du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), lui-même réduit en eau par plusieurs peroxydases (Herrero et al., 2008). Mais la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau est parfois partielle en présence d'un métal comme le Fer (réaction de Fenton), menant à la formation du radical hydroxyle, un des plus forts oxydants existants. L'anion superoxyde ainsi que le radical hydroxyle peuvent réagir avec un nombre important de macromolécules (protéines, ADN, lipides, ...) et de métabolites, générant d'autres radicaux, toxiques pour la cellule (Herrero et al., 2008; Perrone et al., 2008).

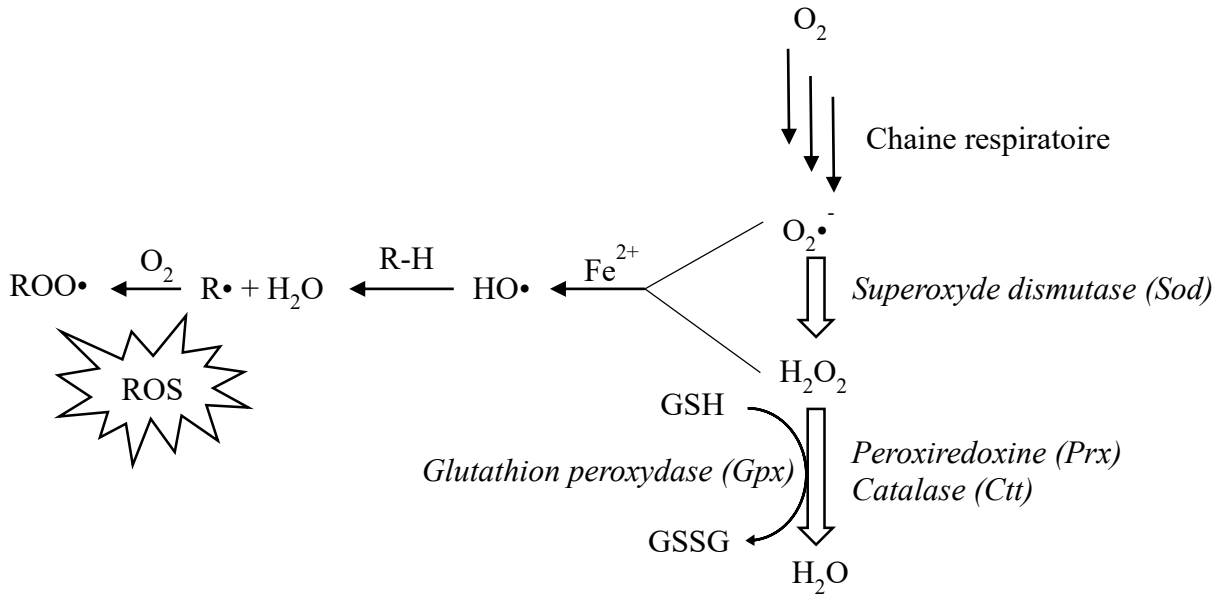


Figure 7 : Schéma métabolique général de la production de ROS chez la levure *S. cerevisiae*.

→ Réactions aboutissant à des ROS.

⇨ Réactions de détoxification des RO.

D'après Herrero et al., 2008 et Perrone et al., 2008.

Cependant, le métabolisme oxydatif des levures change lorsqu'elles sont cultivées dans un environnement pauvre en oxygène comme c'est le cas pendant la fermentation alcoolique. Cet anaérobiose ainsi que la forte concentration en sucres va entraîner la formation de mitochondries dépourvues d'activité respiratoire, appelées pro-mitochondries (Cridde and Schatz, 1969; Salmon et al., 1998). Malgré l'absence de chaîne respiratoire, les levures vont quand même produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par l'intermédiaire d'autres voies métaboliques comme les voies NADPH dépendantes (cytochrome P450 par exemple), capables de générer des anions superoxyde, du peroxyde d'hydrogène et aussi le radical hydroxyle (Landolfo et al., 2008; Rosenfeld and Beauvoit, 2003). De plus, la présence d'éthanol pendant la fermentation a été reportée comme génératrice de ROS, notamment par l'oxydation des lipides membranaires entraînant la perméabilité de celle-ci et pouvant conduire à la mort des cellules (Carmona-Gutierrez et al., 2010; Landolfo et al., 2008; Moradas-Ferreira and Costa, 2013).

Pour lutter contre la génération de ROS au cours de leur croissance, les levures possèdent un système de défense anti-oxydant performant, comprenant la synthèse d'un panel d'enzymes (peroxydases, catalase, superoxyde dismutase, thioredoxine, ...), de facteurs transcriptionnels ou encore de molécules anti-oxydantes comme le glutathion (Perrone et al., 2008). Ce système de défense anti-oxydant est régulé par une multitude de gènes spécifiques mais les défenses enzymatiques se retrouvent peu activées voire pas du tout en situation d'anaérobiose à cause de

la forte concentration en glucose, qui induit la répression de la transcription des gènes de défense anti-oxydante (Costa and Moradas-Ferreira, 2001). Une accumulation de ROS peut alors se former dans les cellules, oxydant nombre de molécules pouvant mener à une diminution de la viabilité des levures voire entrainer leur mort (Lai et al., 2005; Landolfo et al., 2008; Mendes-Ferreira et al., 2010).

#### 4. Interactions pendant la fermentation alcoolique

##### 4.1. Définition des interactions

La présence de différents microorganismes, bactéries, levures ou encore moisissures dans un même environnement entraine des interactions entre chacun. Ces interactions sont décrites depuis de nombreuses années (Odum, 1959) et comprennent le neutralisme, le commensalisme, l'amensalisme, le mutualisme, le parasitisme et la compétition (Tableau 2). Le commensalisme, l'amensalisme, le mutualisme et la compétition sont qualifiées d'interactions indirectes puisqu'elles se traduisent par la production d'un ou plusieurs composés dans le milieu, entrainant l'interaction (Lai, 2010; Liu et al., 2015). Au contraire, le parasitisme est considéré comme une interaction directe, ainsi que le contact cellule-cellule. Ces différentes interactions sont retrouvées dans l'agro-alimentaire dans différents procédés, et notamment la fermentation (Sieuwert et al., 2008).

Tableau 2 : Présentation des différents types d'interactions avec des exemples pour chacun. D'après Frey-Klett et al. (2011) ; Odum (1959) ; Sieuwerts et al. (2008).

	Type d'interaction	Impact sur les deux populations présentes	Exemples
	Neutralisme	Pas d'effet sur les populations	Bactéries du sol et plantes
<b>Interactions indirectes</b>	Compétition	Affecte les deux populations	Nutriments pendant la fermentation d'aliments
	Amensalisme	Une des population produits un composé inhibiteur pour l'autre population, la première n'étant pas affectée	Production d'acide lactique et/ou de peptides antimicrobiens par les bactéries lactiques lors de la fermentation d'aliments
	Commensalisme	Une des populations produit un composé bénéfique pour l'autre population, la première n'étant pas affectée	Désacidification de certains fromages par des levures via leur consommation de l'acide lactique initialement produit par des bactéries lactiques
	Mutualisme	Les deux populations produisent un composé bénéfique pour l'autre population	Fermentation du yaourt
<b>Interactions directes</b>	Parasitisme	Une population survie au détriment de l'autre	Action des bactériophages sur les bactéries
	Contact cellule-cellule	Le contact direct entre les cellules inhibe une des deux populations	non- <i>Saccharomyces</i> et <i>S. cerevisiae</i> en vinification

## 4.2. Les interactions levure-levure pendant la fermentation alcoolique

### 4.2.1. Interactions *S. cerevisiae* / *S. cerevisiae*

La première interaction décrite entre des souches de *S. cerevisiae* différentes a été mise en évidence par Bevan et Makower (1963) avec le caractère « toxin killer ». Ce dernier se caractérise par une souche capable de produire une protéine (toxine) dans le but de tuer une autre souche, mécanisme s'apparentant à de l'amensalisme. Il est possible de retrouver ce type d'interaction lors de la vinification, puisque l'ajout d'une souche commerciale (ferment) de *S. cerevisiae* est très répandue et entraîne des interactions entre cette souche et la ou les souche(s) de *S. cerevisiae* présentes naturellement dans le moût (flore indigène). L'étude de Capece et al. (2013) a montré le caractère « killer » de certains isolats de *S. cerevisiae* indigène lors de

fermentations alcooliques en moût, insistant sur l'importance de ce phénomène lors du choix du ferment. De plus, plusieurs auteurs ont montré que le ferment peut mettre plusieurs jours à s'implanter et à dominer les autres souches de *S. cerevisiae*, avec parfois une incapacité à dominer, mettant en évidence des phénomènes de compétition entre les souches mais aussi d'adaptation au moût avec notamment la forte concentration en sucres (Barrajón et al., 2011; Capece et al., 2013, 2011, 2010; King et al., 2008). De plus, ces études ont aussi montré l'impact des interactions entre les souches de *S. cerevisiae* sur les composés volatils, avec des profils aromatiques différents entre les vins obtenus par les fermentations pures et ceux obtenus par des co-fermentations, de même que le profil du mélange des vins issus des fermentations pures est différent de celui des co-fermentations. Les interactions ayant lieu entre les levures d'une même espèce sont donc importantes et à prendre en considération pour l'élaboration du vin.

#### 4.2.2. Interactions *S. cerevisiae* / non-*Saccharomyces*

Dans le moût, les levures non-*Saccharomyces* sont souvent prédominantes et représentent donc la majorité de la flore indigène (Ciani, 1997; Esteve-Zarzoso et al., 1998). Cette flore diffère en fonction de plusieurs paramètres comme le climat, le cépage ou encore le traitement phytosanitaire (Grangeteau, 2016). Du fait de cette diversité, des interactions surviennent entre les espèces présentes, interactions souvent accentuées par l'ajout de ferments par les professionnels pour assurer la fermentation. En effet, depuis quelques années, des ferments mixtes composés d'une souche de *S. cerevisiae* et d'une souche de non-*Saccharomyces* sont disponibles sur le marché, bien que la complexité des interactions entre ces souches rende difficile de prédire la qualité du produit fini. Ces interactions sont influencées par divers facteurs clé, détaillés dans les parties suivantes.

##### 4.2.2.1. Compétition pour les nutriments

La diversité des microorganismes présents dans le moût au départ de la fermentation induit une compétition pour les nutriments disponibles, en particulier l'oxygène, l'azote et les vitamines nécessaires à la croissance des levures (Alexandre and Charpentier, 1998). Les espèces présentes vont assimiler plus ou moins vite ces nutriments, modulant la croissance de certaines espèces (Jolly et al., 2006). La compétition peut se traduire par une consommation très rapide des nutriments par *S. cerevisiae*, entraînant une mort précoce des non-*Saccharomyces* et donc la perte de leur intérêt bénéfique pour le vin produit. En effet, *Hanseniaspora uvarum* et *Torulasporea delbrueckii* sont deux non-*Saccharomyces* assez sensibles au manque d'oxygène,

l'anaérobie diminue donc rapidement leur viabilité en début de fermentation (Hansen et al., 2001; Wang et al., 2015). Cependant, une technique assez récente reportée par l'étude de Chasseriaud et al. (2018) permettrait de promouvoir le développement de certaines espèces de non-*Saccharomyces*, dont *T. delbrueckii*, en saturant le moût de CO<sub>2</sub> avant le début de la fermentation alcoolique. Par ailleurs, les études de plus en plus nombreuses sur les levures non-*Saccharomyces* ont mis en évidence l'importance de leur consommation en azote et oxygène, surtout pour des fermentations séquentielles puisque dans ce cas le moût peut présenter des carences en ces nutriments lors de l'inoculation de *S. cerevisiae* (Englezos et al., 2018b; Gobert et al., 2017; Hansen et al., 2001; Lleixà et al., 2016; Medina et al., 2012; Wang et al., 2015). Ces auteurs ont ainsi montré que le délai entre l'inoculation de la levure non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae* ainsi que la concentration en azote dans le moût jouaient un rôle important dans le déroulement de la fermentation pour éviter des fermentations languissantes. A titre d'exemple, l'étude de Gobert et al. (2017) a montré que *S. bacillaris* consomme très rapidement la plupart des sources azotées présentes dans le moût, rendant le milieu carencé en azote lors de l'ajout de *S. cerevisiae* au bout de 3 jours de fermentation. Un effet similaire a été observé par Taillandier et al. (2014) avec *T. delbrueckii*, dont la consommation rapide de l'azote dans les premières 48 h de fermentations gêne la croissance de *S. cerevisiae* et conduit à une fermentation languissante. De même, l'étude de Shekhawat et al. (2017) sur l'effet de l'oxygénation sur les performances des levures (non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae*) en co-fermentation a montré qu'en anaérobie, *S. cerevisiae* ne domine pas la fermentation en présence de *L. thermotolerans*, ce qui augmente la durée de la cinétique fermentaire par rapport à une fermentation de *S. cerevisiae* seule. Ces trois études montrent bien l'impact de la consommation de l'oxygène et de l'azote par les levures non-*Saccharomyces* qui entrent en compétition avec *S. cerevisiae*. A ce jour, peu d'études se sont concentrées sur la consommation d'autres nutriments par les non-*Saccharomyces*, comme les vitamines, les acides gras ou encore les phytostérols présents dans le moût et qui sont connus pour être impliqués dans la croissance des levures, notamment dans la structuration de leur membrane, les études portant essentiellement sur *S. cerevisiae* en fermentation seule (Alexandre and Charpentier, 1998; Luparia et al., 2004; Rollero et al., 2016).

## 4.2.2.2. Sécrétion de composés inhibiteurs (amensalisme)

Plusieurs études ont reporté des inhibitions de croissance dues à la production de composés antimicrobiens, de *S. cerevisiae* contre des non-*Saccharomyces* ou l'inverse. En effet, cela fait seulement une dizaine d'année que les études se sont intéressées aux composés antimicrobiens pouvant être produits par les levures au cours de la fermentation. L'étude de Pérez-Nevado et al. (2006) est une des premières à s'intéresser à ces composés, en rapportant une activité antimicrobienne due à un composé toxique produit par *S. cerevisiae* CCMI 885 contre *Hanseniaspora guilliermondii* et *H. uvarum*, deux non-*Saccharomyces* fréquemment retrouvées dans le moût et en début de fermentation (Moreira et al., 2005). L'étude de Albergaria et al. (2009) a enrichi ce résultat en montrant que la souche CCMI 885 de *S. cerevisiae* était capable de produire un peptide d'environ 10 kDa ayant la propriété de causer la mort précoce en co-fermentation de *H. guilliermondii* et *H. uvarum*. L'étude a été poussée un peu plus loin en testant le peptide antimicrobien sur d'autres non-*Saccharomyces* comme *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* et *Kluyveromyces marxianus* et une inhibition de croissance a été observée pour ces trois souches. Dans le même sens, Branco et al. (2014) ont montré que le peptide antimicrobien produit par la souche CCMI 885 de *S. cerevisiae* est un dérivé de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase et a aussi un effet contre des levures d'altération du vin comme *Dekkera bruxellensis*. La production d'un peptide antimicrobien par *S. cerevisiae* a aussi été rapporté par Kemsawasd et al. (2015) avec une action contre *L. thermotolerans*, action renforcée par un mécanisme de contact cellule-cellule, la combinaison de ces deux interactions entraînant une mort précoce de la non-*Saccharomyces* en co-fermentation avec *S. cerevisiae*.

A l'inverse, certaines non-*Saccharomyces* ont montré une activité antimicrobienne, principalement contre des levures d'altération appartenant aux genres *Dekkera/Brettanomyces*, *Pichia* ou encore *Hanseniaspora* (Liu et al., 2015). *M. pulcherrima* est une levure non-*Saccharomyces* connue pour sa production d'acide pulcherrimique, un composé antimicrobien réduisant la disponibilité du fer dans le milieu, inhibant la croissance de certaines levures (Sipiczki, 2006). Un screening de l'action de *M. pulcherrima* sur de nombreuses non-*Saccharomyces* mais aussi sur *S. cerevisiae* a été réalisé par Oro et al. (2014). L'étude a montré que *S. cerevisiae* n'était pas affecté par l'acide pulcherrimique produit par *M. pulcherrima* alors que la plupart des levures testées appartenant aux genres *Dekkera/Brettanomyces*, *Pichia* et *Hanseniaspora* étaient sensibles, ainsi que certaines souches de *T. delbrueckii* ou encore *L. thermotolerans*.

Les levures sont aussi capables de produire des acides gras à moyenne chaîne comme l'acide octanoïque et l'acide décanoïque pendant la fermentation alcoolique, et l'excrétion de ces acides gras dans le milieu peut exercer une activité antimicrobienne sur *S. cerevisiae* ou les non-*Saccharomyces* (Alexandre and Charpentier, 1998; Stratford and Anslow, 1996; Viegas et al., 1989).

#### 4.2.2.3. Mécanisme de contact cellule-cellule

L'inhibition de croissance des cellules par un mécanisme de contact cellule-cellule est bien connu pour les cellules de mammifères lorsque la concentration en cellule atteint un seuil critique (Caveda et al., 1996; Civitelli, 2008; Fukuhara et al., 2003; Imhof et al., 1983). L'existence d'un phénomène similaire entre les levures non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae* a été démontré pour la première fois par Nissen et al. (2003) par la compartimentation des deux espèces pendant la fermentation alcoolique de moût synthétique. En effet, des fermentations alcooliques en moût synthétique de *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* ont été réalisées, ainsi que des co-fermentations avec et sans compartimentation. Les résultats ont montré que les deux levures non-*Saccharomyces* présentaient une croissance maximale inférieure et mourraient précocement en début de fermentation en présence de *S. cerevisiae* comparé aux fermentations pures, mais pas dans la fermentation avec compartimentation. Le contact entre *L. thermotolerans* et *S. cerevisiae* ainsi qu'entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* provoque donc une mort précoce de ces deux non-*Saccharomyces*, à condition que les cellules de *S. cerevisiae* soient viables. Ainsi, la présence d'un composé inhibiteur a été écartée puisque les deux levures non-*Saccharomyces* ne présentent pas d'arrêt de croissance en présence du surnageant de la fermentation de *S. cerevisiae* seule. Des résultats similaires ont été obtenus plus récemment par Renault et al. (2013) en utilisant la même souche de *T. delbrueckii* et cette fois-ci un nouveau système pour compartimenter les deux espèces : un fermenteur à double compartiment séparé par une membrane. Ce système a permis à ces auteurs d'étudier le contact cellule-cellule avec un outil adapté à cette interaction, puisque la membrane laisse passer les molécules du moût (nutriments et métabolites) en empêchant les cellules de la traverser. Ils ont ainsi pu confirmer la présence d'un mécanisme de contact cellule-cellule entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* grâce à ce système, en observant une mort précoce de la non-*Saccharomyces* uniquement en contact avec *S. cerevisiae*. Ce type de fermenteur à double compartiment a aussi été utilisé très récemment dans l'étude de Englezos et al. (2019) pour déterminer les interactions entre *S. bacillaris* et *S. cerevisiae* au cours de fermentations alcooliques. Ces auteurs ont montré



grâce à ce système la présence d'un mécanisme de contact cellule-cellule aussi entre ces deux espèces pendant la fermentation alcoolique de moût de raisin, induisant la mort précoce de *S. bacillaris* au bout de quelques jours uniquement en présence de *S. cerevisiae*. Dans le même esprit, l'étude de Kemsawasd et al. (2015) a montré que l'utilisation d'un système à double compartimentation similaire à celui de Nissen et al. (2003) permet d'étudier les interactions entre *L. thermotolerans* et *S. cerevisiae*. Leurs résultats ont montré que la production d'un peptide antimicrobien par *S. cerevisiae* couplée à un mécanisme de contact cellule-cellule entraîne la mort précoce de *L. thermotolerans* en début de fermentation alcoolique. Cela montre donc que les interactions peuvent se combiner entre elles, avec dans ce cas deux interactions négatives contre une levure non-*Saccharomyces*.

#### 4.2.2.4. Mécanisme de co-floculation

La floculation est décrite chez *S. cerevisiae* depuis la fin des années 1970 comme étant l'adhésion entre deux cellules formant un agrégat appelé floc, mécanisme se déclenchant en réponse à des conditions environnementales défavorables (Calleja, 1984). La floculation fait intervenir une famille de gènes (gènes *FLO*) permettant l'expression de protéines de surface spécifiques (lectines). Ces protéines vont interagir avec des résidus mannoses ancrés dans la membrane pour former les agrégats entre les cellules mais cette interaction requiert la présence d'ion calcium ( $Ca^{2+}$ ) pour être active (Soares, 2011). La floculation est un phénomène important dans l'élaboration de la bière et est aussi observée lors de la vinification, mais sa présence dépend fortement des souches de *S. cerevisiae* retrouvées (Calleja, 1984; Johnson et al., 1988; Soares, 2011). Récemment, l'étude de Rossouw et al. (2015) a montré que certaines non-*Saccharomyces* retrouvées en vinification, appartenant aux espèces *H. uvarum*, *H. vineae*, *L. thermotolerans*, ou encore *M. fructicola*, étaient capables de floculer mais surtout de déclencher la floculation de souches de *S. cerevisiae* non-floculantes formant des floccs mixtes. Cette étude a révélé une nouvelle interaction de type contact entre les levures non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae*, mettant en avant l'intervention des gènes *FLO* pour la formation de floccs mixtes. La viabilité des cellules n'a pas été évaluée lors des floculations mixtes dans cette étude, mais la floculation étant un mécanisme de résistance au stress, cela ouvre de nouvelles perspectives pour améliorer la survie des non-*Saccharomyces* lors de la vinification.

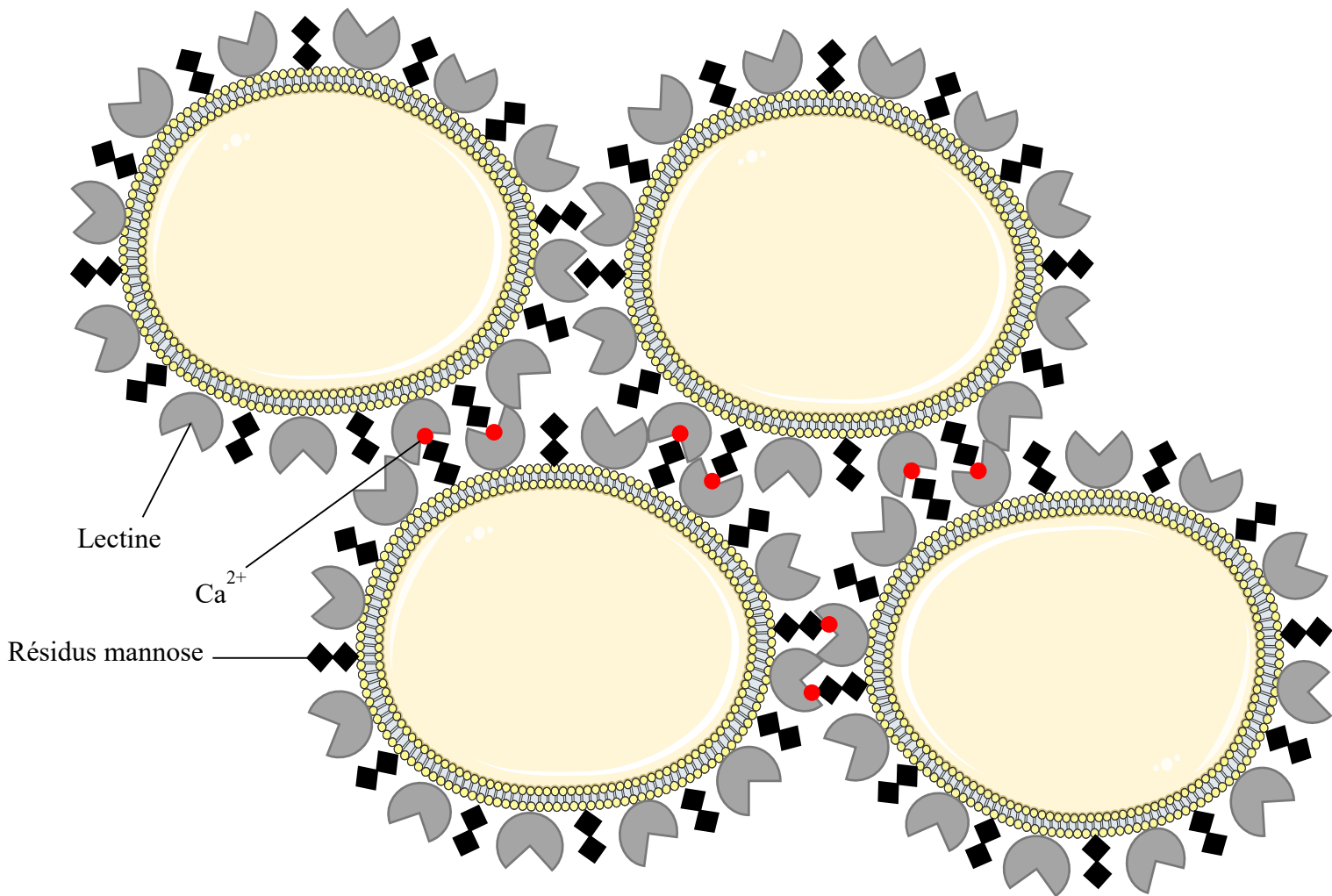


Figure 8 : Mécanisme de flocculation entre les cellules de *S. cerevisiae*. Ce mécanisme fait intervenir des protéines de surfaces de type lectine, des ions calcium et des résidus mannose. Le tout forme un agrégat appelé flocc. D'après Soares, 2011.

#### 4.2.2.5. Quorum-sensing

Lorsque la densité de population atteint un certain seuil, les bactéries à Gram négatif produisent des molécules signales appartenant à la famille des *N*-acyl-homoserine lactone et les bactéries à Gram positif des dérivés d'acides aminés ainsi que des petits peptides, qui vont permettre la régulation de certains paramètres comme la formation de biofilm ou la production d'enzymes extra-cellulaires (Fleet, 2003; Shaw et al., 1997). Cette voie de signalisation a été appelée *quorum-sensing* et est bien décrite chez les bactéries mais a aussi été mise en évidence chez les levures, plus particulièrement chez le pathogène opportuniste *Candida albicans*. En effet, le farnésol a été décrit comme un inhibiteur du dimorphisme de *C. albicans*, empêchant sa transition en biofilm (formation d'hyphes) et donc potentiellement proposée comme stratégie anti-fongique pour lutter contre les candidoses (Ramage et al., 2002). Au contraire, le tyrosol active la formation d'hyphes chez *C. albicans*, augmentant son pouvoir pathogène par la

formation de biofilm (Alem et al., 2006). Par la suite, d'autres molécules ont été décrites comme molécules signales chez *S. cerevisiae* comme le 2-phényléthanol et le tryptophol en plus du tyrosol aussi retrouvé chez cette espèce (Albuquerque and Casadevall, 2012; Chen and Fink, 2006). Ces alcools entreraient en jeu surtout en condition de carence en azote en induisant le passage en phase stationnaire des levures pour s'adapter aux conditions de leur environnement. Plus récemment, l'étude de Zupan et al. (2013) s'est concentrée sur le *quorum-sensing* des levures pendant la fermentation alcoolique, en particulier la production des trois molécules signal, citées précédemment, par *S. cerevisiae* mais aussi par des non-*Saccharomyces*. Ces auteurs ont ainsi mis en évidence la production consécutive de ces molécules par *S. cerevisiae*, mais aussi par certaines non-*Saccharomyces* comme *H. uvarum*. D'autres études très récentes menées par González et al. (2018) et Valera et al. (2019) ont montré aussi la production des trois molécules signal chez des levures non-*Saccharomyces* fréquemment retrouvées et utilisées en vinification comme *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* ou encore *S. bacillaris*, production confirmée lors d'une carence en azote et dans un milieu riche en glucose (moût synthétique). Ces auteurs ont aussi mis en évidence l'importance de ces molécules signal dans le profil aromatique des vins, puisque le 2-phényléthanol est un alcool aromatique plutôt recherché, apportant des notes fruitées au vin.

Cependant, les mécanismes déclenchant la production de ces alcools sont mal connus chez les levures *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces* et nécessitent encore des études pour mieux les comprendre.

## 5. Application de la cytométrie en flux aux microorganismes du vin

Cette partie a été rédigée sous la forme d'une revue scientifique en collaboration égale des deux premiers auteurs.

Résumé de la revue : la cytométrie en flux est une technique puissante pour détecter et quantifier des micro-organismes présents dans un aliment ou pendant les étapes du procédé. Cette technique est basée sur trois systèmes en synergie. La première est la partie fluïdique, qui permet d'entraîner l'échantillon et d'aligner une par une les cellules avant leur passage devant la source lumineuse (laser, LED, ...). Cette dernière émet une longueur d'onde spécifique, et un cytomètre en flux peut posséder plusieurs sources lumineuses. La deuxième est la partie optique, constituée de miroirs et filtres, permettant d'analyser la lumière émise par les cellules après excitation par la source lumineuse. On distingue ainsi le « Forward Scatter » (FSC) qui

donne des informations sur la taille des cellules, le « Side Scatter » (SSC) qui permet d'analyser la granulosité des cellules et enfin un jeu de filtres permettant d'analyser les différentes longueurs d'ondes d'émission des cellules, relatives à la fluorescence. Pour finir, un système électronique permet l'acquisition et le traitement des données en transformant les signaux lumineux en signaux électroniques grâce notamment à des Photo-Multiplicateurs (PMT). En œnologie, la cytométrie en flux est utilisée pour détecter et dénombrer les microorganismes présents dans le vin, notamment les levures et les bactéries, mais aussi pour connaître leur état physiologique en utilisant des marqueurs fluorescents (fluorochromes). Il est ainsi possible de connaître la viabilité des cellules (cellules vivantes), leur vitalité (activité métabolique) ou encore de détecter des états Viable mais Non Cultivable (VNC). Cette revue recense les différents paramètres physiologiques qui ont été analysés par cytométrie en flux sur les bactéries et les levures du vin. Les premiers paramètres détaillés sont la vitalité et la viabilité des cellules, importants à connaître pour assurer une fermentation alcoolique avec succès. Des exemples de double marquage permettant d'avoir les informations sur ces deux paramètres en une seule fois sont aussi présentés. Une partie détaille ensuite les études sur l'état VNC puisque ce dernier a été démontré chez plusieurs espèces de levure comme *S. cerevisiae* ou la levure d'altération du vin *Brettanomyces bruxellensis*, mais aussi chez les bactéries lactiques du vin comme *Oenococcus oeni*. Par la suite, les études concernant le potentiel membranaire, la présence de ROS, la teneur en lipides des cellules ou encore le pH intracellulaire sont détaillées chez les bactéries et les levures du vin. Tous ces paramètres peuvent être analysés par cytométrie en flux grâce à des fluorochromes spécifiques, mais d'autres techniques peuvent être couplées à la cytométrie en flux. L'utilisation d'anticorps marqué par un fluorochrome est évoquée, de même que l'utilisation de la « Fluorescence In Situ Hybridization » (FISH) permettant toutes deux de détecter plus spécifiquement des espèces. De plus, des études montrant l'utilisation de la cytométrie en flux avec des souches modifiées, exprimant par exemple une « Green Fluorescent Protein » (GFP) sont aussi présentées.

Pour finir, des fluorochromes utilisés sur les levures et/ou bactéries du vin mais non encore transposés à la cytométrie en flux sont présentés, ainsi que des techniques complémentaires à la cytométrie en flux comme le triage de cellules ou encore l'utilisation de nouveaux fluorochromes prometteurs comme les aptamères et les « quantum dots ».

Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., and Alexandre, H. (2017). Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiol.* 62, 221–231. doi:10.1016/j.fm.2016.10.023.

### **Application of flow cytometry to wine microorganisms**

Cédric Longin<sup>1\*</sup>, Clément Petitgonnet<sup>1</sup>, Michèle Guilloux-Benatier, Sandrine Rousseaux, Hervé Alexandre

Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Equipe VALMiS, rue Claude Ladrey, BP 27877, F-21078 Dijon, France

\*: corresponding author

<sup>1</sup>: These authors contributed equally to this work

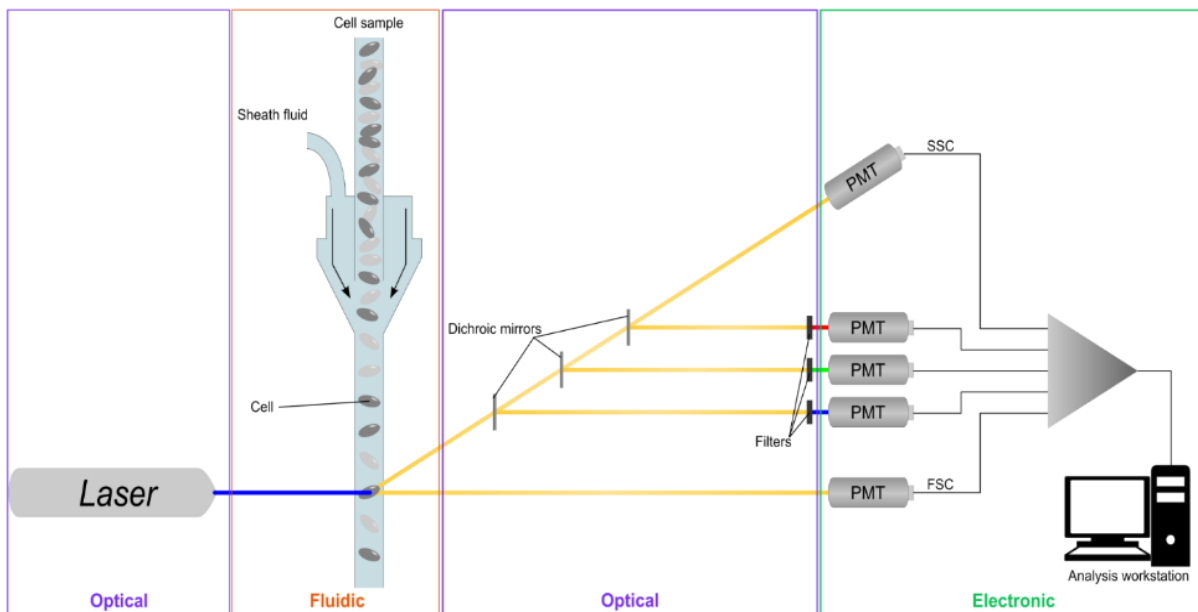
### **Abstract**

Flow cytometry (FCM) is a powerful technique allowing detection and enumeration of microbial populations in food and during food process. Thanks to the fluorescent dyes used and specific probes, FCM provides information about cell physiological state and allows enumeration of a microorganism in a mixed culture. Thus, this technique is increasingly used to quantify pathogen, spoilage microorganisms and microorganisms of interest. Since one decade, FCM applications to the wine field increase greatly to determine population and physiological state of microorganisms performing alcoholic and malolactic fermentations. Wine spoilage microorganisms were also studied. In this review we briefly describe FCM principles. Next, a deep revision concerning enumeration of wine microorganisms by FCM is presented including the fluorescent dyes used and techniques allowing a yeast and bacteria species-specific enumeration. Then, the last chapter is dedicated to fluorescent dyes which are used to date in fluorescent microscopy but applicable in FCM. This chapter also describes other interesting “future” techniques which could be applied to study the wine microorganisms. Thus, this review seeks to highlight the main advantages of the flow cytometry applied to wine microbiology.

**Keywords:** Flow cytometry; Wine yeasts; Wine bacteria; Enumeration; Identification; Physiological state.

## Flow cytometry: an overview and principles

Flow cytometry (FCM) is defined as the study of isolated cells in a liquid flow. It is an individual, quantitative and qualitative method used to characterize particles in liquid suspension. Flow cytometry is a powerful technique used to analyze multiple parameters of individual cells within heterogeneous populations. Several reviews and books have been dedicated to the principle of flow cytometry and given numerous details (Díaz et al., 2010; Longobardi-Givan, 2013; O'Neill et al., 2013). In the sake of brevity, a flow cytometer is composed of three main parts: fluidic, optical, and, electronic systems (Fig. 1).



**Fig. 1.** Flow cytometer composed of fluidic, optical and, electronic systems.

### *Fluidic system*

The fluidic component is composed of a flow chamber that separates and aligns particles (Fig. 1). Most flow cytometers accomplish this by injecting the sample stream containing the cells into a flowing stream of sheath fluid or saline solution. The sheath liquid undergoes gradual acceleration which stretches the liquid sample and thus aligns the cells in the jet center (Díaz et al., 2010). Then the cells pass through the light source with the refraction or scattering of light at all angles. The light sources may be a laser, arc lamp or light emitting diode (LED). Most flow cytometers use a laser as light source. A laser provides a bright and consistent light source with a narrow, specific and well-defined wavelength. Many different types of lasers are currently available and this number is increasing. Some commonly used lasers include argon, krypton, helium-neon, cadmium helium lasers and Yag lasers (Shapiro, 2003).

### *Optical system*

The light emitted from the cells after they are irradiated in the flow chamber is directed to a detector array by a complex system of mirrors and filters which compose the optical system (Fig. 1). Forward scatter (FSC), or low-angle light scatter, is the amount of light scattered in the forward direction when the laser light strikes the cell (Díaz et al., 2010). The magnitude of forward scatter is roughly proportional to the size of the cell and this data can be used to quantify this parameter. Moreover, a cell traveling through the laser beam will scatter light at all angles. Light scattering at larger angles, for example to the side, is caused by granularity and structural complexity inside the cell (Díaz et al., 2010). This side-scattered (SSC) light is focused through a lens system and collected by a separate detector, usually located 90 degrees from the laser beam's path. The characteristics of front and side light scattering can be used to identify cell types that differ by their size and granularity. A second focusing lens is used to direct the light rays to a set of filters that separate the various wavelengths present. High-pass filters allow light only above a certain wave frequency while low pass filters allow light only below a certain frequency. Together, these two filters form a band pass filter. In a population of labeled cells, cells cross the path of the laser and generate a fluorescence signal. The fluorescent light is then directed to the appropriate detector.

### *Electronic system*

Light which passes through an optical system will be converted into electronic signals generated by photodiodes and photomultiplier tubes (PMT) and collected to enable data acquisition and analysis (Fig. 1). This is accomplished through photodiodes (frontal dispersion; FSC) and PMT for fluorescent rays and signals associated with side scatter light (SSC). Some modern flow cytometers can have up to 12 PMT, though this number has not increased with the development of new technologies.

### *Flow cytometry for enological studies*

Most flow cytometry protocols applied in enology that will be described in details in the following sections concern detection and enumeration of wine microorganisms, defined respectively as presence/absence of microorganisms and determination of the population level. Using different dyes coupled to flow cytometry, physiological analysis of wine yeast and bacteria could be performed. Viability could be assessed which corresponds to living cells which are the sole able to perform alcoholic fermentation. However, viable cells could have a

weak activity which will impact the alcoholic fermentation rate, for this reason it is interesting to measure the yeast vitality which reflects yeast activity. Finally, the presence of Viable But not Culturable (VBNC) cells could also be assessed. This specific physiological state is characterized by the inability of the cells to grow in a culture media, even though they are still viable and maintain a detectable metabolic activity. Such physiological state is important to monitor, since in wine conditions it could lead to future wine spoilage as described below.

Thanks to these different physiological characteristics, a precise monitoring of the alcoholic fermentation and the malolactic fermentation can be performed. The first fermentation is conducted by yeasts which convert sugars such as glucose, fructose into cellular energy, producing ethanol and carbon dioxide. The second fermentation is achieved by bacteria. This biological process converts malic acid to lactic acid and carbon dioxide into cells, leading to an increase of the wine pH value.

### **Enumeration of wine microorganisms by FCM**

Wine is a complex matrix containing many compounds and microorganisms such as yeasts, lactic acid bacteria (LAB) and sometimes acetic acid bacteria (AAB). The yeast responsible for alcoholic fermentation (AF) is mainly *Saccharomyces cerevisiae*. Non-*Saccharomyces* yeasts are also present on grape berries, in grape must and during AF. Moreover, yeasts such as *Brettanomyces bruxellensis* and *Candida vini*, considered as spoilage yeasts, may be found during the winemaking process. Regarding bacteria, the most abundant LAB in wine are *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus damnosus* and also species include *O. oeni* and *L. brevis* (Munoz et al., 2011). *O. oeni* is mainly known to perform malolactic fermentation (MLF) while AAB such as *Acetobacter* spp., *Gluconobacter* spp., *Gluconacetobacter* spp. can also be found throughout the winemaking process (Guillamon and Mas, 2011). Winemakers must know the populations performing fermentations and the concentration of spoilage microorganisms in order to make quality wine. Different techniques are available to detect and/or quantify these microorganisms in wine and during the fermentation steps.

One of them consists in spreading a wine sample on selective agar plates to enumerate cells and obtain information on the microorganisms present, but this technique takes too long to obtain results (generally between 2 and 10 days) and cannot detect Viable But Non-Culturable (VBNC) cells which are common in wine (Bouix and Ghorbal, 2013; Bouix and Leveau, 2001; Branco et al., 2012; Salma et al., 2013; Serpaggi et al., 2012).



Microscopy is another technique used to enumerate cells using a specific chamber, like Malassez or Thoma chambers (Bouix and Leveau, 2001), but it is a long, fastidious and subjective method. Nevertheless, cells can be stained with dyes to determine specific cell functions or with species-specific fluorescent-labelled oligonucleotide probes and visualized by the Direct Epifluorescence Filter Technique (DEFT) using a fluorescent microscope. This technique is quite long, fastidious and the results are also subjective (Bruetschy et al., 1994). In addition, techniques based on Polymerase Chain Reaction (PCR), like quantitative PCR (qPCR) can also detect and quantify microorganisms. Indeed, thanks to oligonucleotide primers able to bind specifically to a target DNA sequence and to the fluorescence emitted by DNA intercalant (like SybrGreen) or fluorescent probes (like Taqman) in each cycle of PCR, this technique give a high specific detection and enumeration of a target microorganism. However, this technique requires a DNA extraction step before qPCR and the extraction yield can be perturbed by complex wine compositions, especially those of red wines which contain a large quantity of polyphenols. These molecules can interfere with the cell membrane (Morata et al., 2003; Razmkhab et al., 2002), influencing cell lysis during DNA extraction and leading to a low DNA extraction yield. Moreover, DNA amplification problems are often encountered due to inhibitory substances such as tannins, polysaccharides and pigments (Rossen et al., 1992; Wilson, 1997).

The FCM method allows both the detection and enumeration of microorganisms with rapidity and high specificity. Firstly, FCM can be used to monitor the physiological state of cells during AF or MLF, using specific dyes. Furthermore, FCM can be used to specifically detect and quantify spoilage microorganisms like AAB and certain yeast species directly in finished wine. Recent advances in FCM make these alternative tools relevant compared to other methods. In addition to its capacity to specifically quantify microorganisms, this technique may provide information on the physiological state of the cells. Thus, the aim of this review is to show the potential of FCM, its effectiveness and describe its applications to the winemaking process and wine microbiological controls.

#### *Microorganism enumeration and physiological state analysis by flow cytometry*

Yeast and bacteria enumeration may be performed by flow cytometry. According to the wine studied, especially red wine, enumeration can be more difficult due to the increase of background noise, which may be confounded with bacteria and sometimes even with yeasts. Nowadays, many fluorescent dyes (permeant DNA stains) are commercially available and allow microorganism staining to facilitate detection and enumeration, even in the case of

considerable background noise. These fluorescent dyes include SYTO dyes like SYTO 9, SYTO 13 and SYTO 17 and they are essentially non-fluorescent until they bind to nucleic acids. Also used are DAPI and SYBR dyes which are already fluorescent; their fluorescence improves when they are bound to DNA (Díaz et al., 2010). Using cellular autofluorescence for a cell population can give different results according to the medium in which it is grown. Therefore, medium composition appears very important and several studies on wine coupled with FCM have been performed in different matrixes, such as in natural grape musts, synthetic musts, synthetic wines or directly in wines (white and red wines). The authors of other studies performed their experiments in growth medium. Table 1 references all the matrixes used in FCM with the enological applications. The differences between the synthetic media cited in this review are given in Table 2.

**Table 1**

Several applications of dyes to enological microorganisms.

Functions	Dyes	Applications	Matrix	References
<b>Vitality</b>	FDA	AF microorganisms	Pinot Noir grape must; Red wine	Malacrinò et al., 2001
			Synthetic wine	Salma et al., 2013
			White and Red wines	Gerbaux and Thomas, 2009
		MLF microorganisms	Growth medium	Bouix et Ghorbal, 2013
			White wine	Salma et al., 2012
	cFDA	AF microorganisms	Red wine	Malacrinò et al., 2001
			Synthetic must	Bouix and Leveau, 2001
FUN-1	AF microorganisms	Synthetic wine	Bouchez et al., 2004 Salma et al., 2013	
<b>Viability (membrane integrity)</b>	PI	Sediment monitoring	Wine	Gerbaux and Thomas, 2009
		AF microorganisms	Synthetic must	Landolfo et al., 2008
				Mannazzu et al., 2008
				Branco et al., 2012
				Delobel et al., 2012
		MLF microorganisms	Red and White must	Chaney et al., 2006
			White must	Farthing et al., 2007
Growth medium	Bouix et Ghorbal, 2013			
White and Red wines	Salma et al., 2012			
<b>Vitality and Viability</b>	CV6/PI	AF microorganisms	Cider must	Herrero et al., 2006
	cFDA/PI		Growth medium	Monthéard et al., 2012
	CV6/PI	MLF microorganisms	Growth medium	Da Silveira et al., 2002
			Cider	Bouix et Ghorbal, 2013 Herrero et al., 2006
<b>VBNC State (Flow cytometry versus Petri dish)</b>	Specific probe	AF microorganisms	Synthetic must	Andorra et al., 2011
	FDA	Spoilage yeast	Synthetic wine	Serpaggi et al., 2012
	CV6/PI	MLF microorganisms	Cider	Herrero et al., 2006
			Apple must and green cider	Quiros et al., 2009
<b>Cell Cycle Analysis</b>	SYBR Green	AF microorganisms	Synthetic must	Mendes-Ferreira et al., 2010
	PI		Synthetic wine	Salma et al., 2013
<b>Membrane potential</b>	DiBAC <sub>4</sub> (3)	AF microorganisms	Synthetic "beer wort"	Kobayashi et al., 2007
		MLF microorganisms	Growth medium	Bouix and Ghorbal, 2013
			White and Red wines	Salma et al., 2012
<b>Reactive Oxygen Species (ROS) presence</b>	MitoTracker® Red CMXRos	AF microorganisms	Synthetic must	Mendes-Ferreira et al., 2010
	DHE			Mendes-Ferreira et al., 2010
	DHR		Synthetic "beer wort"	Kobayashi et al., 2007
<b>Intracellular Lipid Content</b>	Nile Red	AF microorganisms	Synthetic must	Mannazzu et al., 2008
<b>Intracellular pH (pH<sub>in</sub>)</b>	cFDA-SE and CDCF	MLF microorganisms	Growth medium and white wine	Bouix and Ghorbal, 2015

**Dyes:** FDA: Fluorescein diacetate; cFDA: Carboxy fluorescein diacetate; FUN-1: 2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide; PI: Propidium iodide; CV6: Chemchrom V6; DiBAC<sub>4</sub>(3): Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol; DHE: Dihydroethidium; DHR: Dehydrorhodamine; cFDA-SE: 5,6 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; CDCF: 5–6 carboxy 2'7'-dichlorofluorescein

**Applications:** AF: Alcoholic fermentation; MLF: Malolactic fermentation; VBNC: Viable but non culturable

**Table 2**  
Compositions of synthetic media used.

Synthetic medium	References	Compositions
<b>Growth medium</b>	Bouix and Ghorbal, 2013	Casamino acids (5 g.L <sup>-1</sup> ); Yeast extract (4 g.L <sup>-1</sup> ); Glucose (5 g.L <sup>-1</sup> ); Fructose (3.5 g.L <sup>-1</sup> ); DL-Malic acid (10 g.L <sup>-1</sup> ); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.6 g.L <sup>-1</sup> ); KCl (0.45 g.L <sup>-1</sup> ); CaCl <sub>2</sub> (0.13 g.L <sup>-1</sup> ); MgSO <sub>4</sub> (0.13 g.L <sup>-1</sup> ); MnSO <sub>4</sub> (0.003 g.L <sup>-1</sup> ); Tween 80 (1 mL); pH 4.5
	Monthéard et al., 2012	Xylose (20 g.L <sup>-1</sup> ); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (4.5 g.L <sup>-1</sup> ); (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3 g.L <sup>-1</sup> ); Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12 H <sub>2</sub> O (1.5 g.L <sup>-1</sup> ); Sodium glutamate (1 g.L <sup>-1</sup> ); MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O (1 g.L <sup>-1</sup> ); ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O (40 mg.L <sup>-1</sup> ); MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (3.8 mg.L <sup>-1</sup> ); CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O (21 mg.L <sup>-1</sup> ); CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O (2 mg.L <sup>-1</sup> ); Na <sub>2</sub> MoSO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O (4.1 mg.L <sup>-1</sup> ); CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O (23 mg.L <sup>-1</sup> ); (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> ·6 H <sub>2</sub> O (23 mg.L <sup>-1</sup> ); H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (3 mg.L <sup>-1</sup> ); Panthotenate (3.7 mg.L <sup>-1</sup> ); Thiamine (1 mg.L <sup>-1</sup> ); Nicotinic acid (1.5 mg.L <sup>-1</sup> ); Pyridoxine (0.5 mg.L <sup>-1</sup> ); Meso-inositol (553.9 mg.L <sup>-1</sup> ); Para-aminobenzoic acid (0.2 mg.L <sup>-1</sup> ); Biotin (0.01 mg.L <sup>-1</sup> )
<b>Synthetic must</b>	Andorra et al., 2011	Glucose (110 g.L <sup>-1</sup> ); Fructose (110 g.L <sup>-1</sup> ); Tartaric acid (6.0 g.L <sup>-1</sup> ); L-(2)-Malic acid (3.0 g.L <sup>-1</sup> ); Citric acid (0.5 g.L <sup>-1</sup> ); Yeast Nitrogen Base (YNB) (1.7 g.L <sup>-1</sup> ); Casamino acids (CAA) (2.0 g.L <sup>-1</sup> ); CaCl <sub>2</sub> (0.2 g.L <sup>-1</sup> ); Arginine-HCl (0.8 g.L <sup>-1</sup> ); L-(2)-Proline (1.0 g.L <sup>-1</sup> ); L-(2)-Tryptophane (0.1 g.L <sup>-1</sup> ); pH 3.5
	Bouchez et al., 2004	Dextrose (150 g.L <sup>-1</sup> ); Yeast extract (2.5 g.L <sup>-1</sup> ); (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2.5 g.L <sup>-1</sup> ); K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2.5 g.L <sup>-1</sup> ); MgSO <sub>4</sub> (0.5 g.L <sup>-1</sup> ); pH 4 or 3.2
	Bouix and Leveau, 2001	Dextrose (150 g.L <sup>-1</sup> ); Yeast extract (2.5 g.L <sup>-1</sup> ); (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2.5 g.L <sup>-1</sup> ); K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2.5 g.L <sup>-1</sup> ); MgSO <sub>4</sub> (0.5 g.L <sup>-1</sup> ); pH 4 or 3.2
	Branco et al., 2012	Glucose (110 g.L <sup>-1</sup> ); Fructose (110 g.L <sup>-1</sup> ); L-(1)-Tartaric acid (6 g.L <sup>-1</sup> ); L-(2)-Malic acid (3 g.L <sup>-1</sup> ); Citric acid (0.5 g.L <sup>-1</sup> ); YNB (1.7 g.L <sup>-1</sup> ); Casamino acids (2 g.L <sup>-1</sup> ); CaCl <sub>2</sub> (0.2 g.L <sup>-1</sup> ); Arginine-HCl (0.8 g.L <sup>-1</sup> ); L-(2)-Proline (1 g.L <sup>-1</sup> ); L-(2)-Tryptophane (0.1 g.L <sup>-1</sup> ); pH 3.5
	Delobel et al., 2012	Glucose (115 g.L <sup>-1</sup> ); Fructose (115 g.L <sup>-1</sup> ); Assimilable nitrogen (142 mg of N.L <sup>-1</sup> ); Ergosterol (0.75 mg.L <sup>-1</sup> ); Oleic acid (0.25 µL.L <sup>-1</sup> ); pH 3.3
	Landolfo et al., 2008	Glucose (120 g.L <sup>-1</sup> ); Fructose (120 g.L <sup>-1</sup> ); (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (7 g.L <sup>-1</sup> ); Yeast Nitrogen Base (YNB) without amino acids (2 g.L <sup>-1</sup> ); pH 4.3
	Mannazzu et al., 2008	Glucose (120 g.L <sup>-1</sup> ); Fructose (120 g.L <sup>-1</sup> ); (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (7 g.L <sup>-1</sup> ); Yeast Nitrogen Base (YNB) without amino acids (2 g.L <sup>-1</sup> ); Leucin (30 mg.L <sup>-1</sup> ); Histidine (20 mg.L <sup>-1</sup> ); Uracil (20 mg.L <sup>-1</sup> ); pH 4.4
	Mendes-Ferreira et al., 2010	Formulated by Henschke and Jiraneck (1993) with Glucose (200 g.L <sup>-1</sup> ); Diamonium phosphate (267 or 67 mg of N.L <sup>-1</sup> )
<b>Synthetic "beer wort"</b>	Kobayashi et al., 2007	Maltose (100 g.L <sup>-1</sup> ); Glucose (40 g.L <sup>-1</sup> ); Yeast extract (6 g.L <sup>-1</sup> )
<b>Synthetic wine</b>	Salma et al., 2013	Glucose (1.5 g.L <sup>-1</sup> ); Fructose (1.5 g.L <sup>-1</sup> ); Yeast extract (1 g.L <sup>-1</sup> ); MgSO <sub>4</sub> (0.025 g.L <sup>-1</sup> ); K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.1 g.L <sup>-1</sup> ); Acetic acid (0.01%); DL-Malic acid (3 g.L <sup>-1</sup> ); Ethanol (8%); pH 3.5
	Serpaggi et al., 2012	Glucose (1.5 g.L <sup>-1</sup> ); Fructose (1.5 g.L <sup>-1</sup> ); Yeast extract (1 g.L <sup>-1</sup> ); MgSO <sub>4</sub> (0.025 g.L <sup>-1</sup> ); K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.1 g.L <sup>-1</sup> ); DL-Malic acid (3 g.L <sup>-1</sup> ); Acetic acid (0.01%); Ethanol (10% v/v); pH 3.5

### Cell vitality

In order to perform wine fermentations, yeasts and bacteria must be alive and metabolically active. Thus, FCM is an appropriate technique for monitoring AF performed mainly by *S. cerevisiae*, or MLF performed mainly by *O. oeni*. Vitality dyes determine life essential functions such as enzyme activity. Fluorescein Di-Acetate (FDA) is a well-known dye commonly used in many applications due to its quick and easy staining protocol and allows obtaining results on cell vitality, such as that of *S. cerevisiae* in synthetic wine (Malacrino et al., 2001; Salma et al., 2013), in Pinot Noir grape must and red wine (Malacrino et al., 2001),

and in both red and white wines (Gerbaux and Thomas, 2009) during AF. Indeed, FDA staining reflects cell enzyme activity through esterase activity, highlighting the metabolic activity of cells.

### Yeasts

This dye can rapidly inform on the cell vitality of a population in single or mixed cultures in wine, as well as during AF and MLF. Malacrinò et al. (2001) showed a good correlation between plate counts and the enumeration of *S. cerevisiae* stained with FDA. Likewise, cFDA is another marker of vitality widely used in synthetic must (Bouchez et al., 2004; Bouix and Leveau, 2001; Monthéard et al., 2012) and relies on mechanism similar to FDA. Good correlation between plate counts of *S. cerevisiae* and cFDA staining was also demonstrated by Bouix and Leveau (2001). cFDA has the particularity of being better retained in cells as this compound is more negatively charged than FDA, whose enzymatic products, fluorescein, can be released from the cell to the buffer, leading to a decrease in the fluorescent signal (Bouix and Leveau, 2001; Prospero et al., 1986). Another fluorescent dye recently used in fermentation monitoring in synthetic wine is [2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide], also called FUN-1, which can inform on both metabolic activity and membrane integrity (Salma et al., 2013). Indeed, this dye is able to enter through cell walls by passive diffusion and emits a yellow-green cytoplasmic fluorescence. But the real interest of FUN-1 dye is the formation of cylindrical intra-vacuolar structures (CIVS) in yeast (Henry-Stanley et al., 2004), which emit a red fluorescence, resulting in the decrease of the cytoplasmic green fluorescence. CIVS formation can only be achieved if the cells present non-damaged membranes and active metabolism. Thus, dead cells are stained yellow-green and live cells (i.e. with an intact membrane and metabolically active) are stained red, resulting in a double-staining method with only one dye.

### Bacteria

Regarding bacteria, Malacrinò et al. (2001) compared the enumeration of *O. oeni* in red wine by FCM versus plate counts on AGB. They tested four fluorescent dyes: Rhodamine 123; Calcein acetoxymethyl ester (Calcein-AM); 2', 7'-bis-carboxyethyl -5(6)- carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM) and FDA. They showed that the fluorescence intensity of labelled malolactic bacteria varies considerably according to the dye used and the strain tested. They found that the majority of *O. oeni* strains studied could be stained with FDA. However, 40% of *O. oeni* strains were fluorescent in 10–15 min, 30% in 60 min, while two strains could

not be labelled at all. The ability of FDA to stain viable cells is based on its cleavage in living cells, but it has been reported that fluorescein can leak out of the cells after it has been cleaved (Diaper and Edwards, 1994). This problem leads to a significant difference for *O. oeni* enumeration in Bardolino wine between both enumeration methods, i.e. plate counts and FCM (Malacrinò et al., 2001). The study by Salma et al. (2012) showed that *O. oeni* enumeration using FDA staining as vitality marker is possible in white wine compare to plate counting ( $r^2$ : 0.92). Bouix and Ghorbal (2013) demonstrated a poor correlation between cFDA fluorescence and plate counts during the latency period and at the end of growth in FT80. These latter results appear to run counter those of Salma et al. (2012), maybe because Bouix and Ghorbal (2013) worked with FT80 medium which is different to the white wine medium used by Salma et al. (2012). Moreover, lower esterase fluorescence and an increase of cell autofluorescence through time in red wine (Fig. 3) can lead to difficulties in interpreting vitality. Moreover, regarding esterase activity, special attention must be given to FDA incubation: pH (7.6), temperature (30°C) and time (20 min). Enzyme activity in these conditions is maximal (Adam and Duncan, 2001).

These markers are not specific, but they can be used during AF and MLF since, generally, only one species of yeasts or bacteria is present during these steps. However, in mixed culture conditions, these fluorescent dyes do not allow quantifying the vitality of each species.

### Cell viability

Viability dyes determine if cells are in a physiological state sufficient to ensure their survival, and include measurements such as cell membrane permeability. Propidium Iodide (PI) is frequently used as a marker of membrane integrity (permeability) (Delobel et al., 2012). PI enters cells with permeable membranes (i.e. dead cells) and stains nucleic acids. PI staining results in the emission of red fluorescence (Fernandes et al., 2013; Landolfo et al., 2008; Mannazzu et al., 2008). Nevertheless, a significant disadvantage may occur when using PI: cell exposure to stressors like ethanol, which is known to permeabilize membranes (Alexandre et al., 1994), can result in staining live cells red (Davey and Hexley, 2011). This drawback may disturb the utilization of PI in wine due to ethanol formation during AF.

### Yeasts

However, PI is currently used in wine for sediment monitoring (Gerbaux and Thomas, 2009) and for monitoring AF microorganisms in synthetic must (Branco et al., 2012; Delobel et al., 2012; Landolfo et al., 2008; Mannazzu et al., 2008). Chaney et al. (2006) and Farthing et al.

(2007) reported a yeast viability control during AF using Thiazole Orange (TO), a permeant DNA-reactive dye that stains all cells (both dead and live) to discriminate cells from wine debris and PI, leading to a double-staining procedure for monitoring AF in red and white must. Branco et al. (2012) also used a double-staining procedure including 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), a fluorescent-blue dye that stains all cells (both dead and live), and PI staining in synthetic must, to assess the viability during fermentation of *S. cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* in single and mixed-cultures. In this study, they concluded that PI was an excellent stain for estimating the survival rate of yeast species during AF. Delobel et al. (2012) revealed an *S. cerevisiae* sub-population, called “fragile cells”, after PI staining during AF in a synthetic must. This sub-population seemed to be formed by permeabilized cells stained by PI and thus damaged cells; however, they were not dead because this state was reversible. Nevertheless, the authors demonstrated that this sub-population only occurs in a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  starvation condition. Thus, these chemical elements were important to maintain membrane impermeability and stability.  $\text{Mg}^{2+}$  could play a role in enzyme activation and cell membrane stabilization (Delobel et al., 2012).

### Bacteria

Regarding wine bacteria, PI is sometimes used with other dyes such as SYTO 9 (LIVE/DEAD<sup>®</sup> kit, Invitrogen), which stain all bacteria green, in order to estimate more precisely the ratio of live/dead cells, as previously described, in growth medium (Bouix and Ghorbal, 2013). However, Mason et al. (1998) demonstrated that ethanol fixation modified outer membrane integrity in gram-negative organisms, causing a change of staining by PI (Gant et al., 1993; Roth et al., 1997). Salma et al. (2012) showed the difficulty of separating debris from bacteria using FCM, especially in red wine. The dyes tested in previous reports did not allow efficient staining of bacteria. Using FCM and a combination of DiBAC<sub>4</sub>(3), widely called bis-oxonol or BOX, which measures membrane potential and serves as a counterstain, combined with PI dye, they were able to count *O. oeni* in wine during MLF. The analysis showed a strong correlation between the numbers of BOX / PI stained cells determined by FCM and the cell numbers determined by plate counts (red wine:  $r^2$ : 0.97, white wine  $r^2$ : 0.97) (Salma et al., 2012). The main objective was to determine the viability and leavening power of *O. oeni* during adaptation steps and before inoculation. Unfortunately, in cases of contamination, such as those encountered in the case of stuck fermentation, these methods cannot be used to distinguish *O. oeni* from the other types of spoilage bacteria. However, this is not a serious issue during fermentation because spoilage bacteria normally cause wine spoilage only during aging in the

cellar and after bottling (Salma et al., 2012). Bouix and Ghorbal (2013) showed that double staining by SYTO 9 / PI demonstrated that they were effective dyes for *O. oeni* enumeration. However, these results were validated in growth medium and not in an enological context. As vitality markers, these fluorescent dyes are not specific, and quantifying the viability of one population in a mix of several species is not possible.

#### Viability and vitality double staining

Da Silveira et al. (2002) studied carboxyfluorescein (cF) retention and PI exclusion in *O. oeni* adapted to ethanol or not in FT80 medium. Fluorescence was measured after 16% (v/v) ethanol stress and without stress. The results showed no significant differences for either fluorescent dye without stress. However, ethanol stress led to a decrease of cF fluorescence of about 25% and an increase of PI fluorescence of about 80%. When cells were ethanol-adapted, they exhibited cF fluorescence of about 80% and PI fluorescence of about 60%. First, these results showed that ethanol adaptation was important for *O. oeni* vitality and viability during ethanol stress. Second, they demonstrated that PI fluorescence depends on the presence of ethanol. Thus PI was probably not adapted to quantifying bacterial viability in wine. In the study by Da Silveira et al. (2002), the authors used carboxyfluorescein (cF) retention as a viability marker, showing an increase of fluorescence from 15 min to 60 min, contrary to Malacrinò et al. (2001), who observed a decrease of FDA fluorescence over time. Bouix and Ghorbal (2013) also used cFDA coupled with PI to monitor *O. oeni* during cell growth. However, they concluded that cFDA staining was not recommended to monitor bacterial growth because erroneous counts were highlighted during the latency period and at the end of growth. Regarding yeast enumeration, Herrero et al. (2006) studied cider AF yeasts (*S. cerevisiae* var. *bayanus*) using CV6, PI and DRAQ5 to quantify vitality, viability and total population, respectively. They demonstrated a high percentage of cells with considerable esterase activity and low cell permeability during cider AF. Monthéard et al. (2012) performed a double-staining procedure with PI and cFDA on *Candida shehatae* in growth medium. Few cells exhibited double fluorescence, revealing cells with damaged membranes but still metabolically active. Herrero et al. (2006) also used flow cytometry to monitor *O. oeni* states during a cider malolactic fermentation process. They excluded SYTOX orange and TOTO-1 dyes from their study as the results of these dyes were inconsistent. They preferred to use DRAQ5 to enumerate total population and ChemChrom CV6 and PI to detect viable bacteria, compared to colony formant unit (CFU) in plate counting.



Regarding MLF, they demonstrated an increase of bacteria labeled with PI. Moreover, the number of CV6 and PI stained bacteria was higher compared to total enumeration, suggesting a double stained bacterium, described previously by Amor et al. (2002). This problem may be due to the amount of ethanol produced by yeasts during AF, leading to the permeabilization of bacteria to PI, as in the case of yeasts presented by Davey and Hexley (2011).

Regarding vitality and viability fluorescent dyes, the choice is complex and depends on the microorganisms tested and the growth medium. Each dye has advantages and disadvantages, so progress must be made in developing new vitality and viability markers to obtain sensitive and reliable results under all wine conditions.

#### Viable But Non Culturable (VBNC) state

In most scientific publications, flow cytometry techniques are not used alone to assess cell viability. Indeed, culture-dependent or independent methods like plate counts, microscopy and optical density are used to complement flow cytometry analysis. Also, when cell viability is assessed by flow cytometry, researchers often confirm whether the cells are cultivable on agar plates.

#### Yeasts

Andorra et al. (2011) mentioned that no difference between FCM and plate count data was established during AF with *S. cerevisiae* and *H. guilliermondii* in pure cultures. However, in mixed culture, *H. guilliermondii* yeasts exhibited a positive FCM signal, highlighting active cell metabolism, but no colony on agar plates could be counted after 100 h and 140 h according to the fermentation process, suggesting a yeast VBNC state in shaken and static cultures respectively. The effect of SO<sub>2</sub> was also studied by FCM as it is known to cause the entry of yeasts to a VBNC state (Divol and Lonvaud-Funel, 2005). Serpaggi et al. (2012) reported the VBNC state of the spoilage yeast *B. bruxellensis* in synthetic wine by comparing cultivable yeasts on agar plates and viability assessment with FDA staining. Salma et al. (2013) also studied the effect of SO<sub>2</sub> on the entry of *S. cerevisiae* cells into the VBNC state with resuscitation without cell growth.

#### Bacteria

Moreover, a study by Herrero et al. (2006) focused on malolactic bacteria and showed a mean percentage of about 70% of bacteria in VBNC state during the cider MLF process. They also showed the variability of VBNC state during the process, probably due to low pH, the presence

of ethanol and nutrient deficiency. Quirós et al. (2009) studied VBNC state in apple must and green cider and proved that the VBNC state of malolactic bacteria induced by SO<sub>2</sub> increases fermentation process time, likely due to a reduction in substrate transport and metabolic activity levels, in order to minimize cellular energetic requirements (Oliver, 2005).

#### Cell cycle analysis

Cell cycle analysis provides knowledge on the state of cells and thus cell vitality. Mendes-Ferreira et al. (2010) and Salma et al. (2013) studied this parameter in *S. cerevisiae*. The first authors studied the influence of nitrogen during AF in synthetic must using SYBR Green as the cell cycle phase dye. The cell cycle was stopped in phases G0/G1 when nitrogen was exhausted from the medium. Salma et al. (2013) studied the cell cycle during VBNC state using PI dye in synthetic wine. Cells exited from VBNC state without DNA replication, so without growth when environmental stress was removed, validating the VBNC state of *S. cerevisiae*. Recently, Steensels et al. (2014) and Walther et al. (2014) used FCM to measure the DNA content of several *S. cerevisiae* strains with a PI staining procedure in growth medium. Cells were separated according to their fluorescence intensity which reflects the DNA content due to PI binding to DNA after cell permeabilization with 70% ethanol. The same protocol was used by Jayakody et al. (2014) in growth medium. They studied the impact of adding fermentation inhibitors to cell cycles and concluded that inhibitors such as glycolaldehyde, furfural, 5-hydroxymethylfurfural, methylglyoxal and acetic acid caused G2/M arrest in control yeast cells. Thus, cell cycle analysis provides knowledge on cell growth and therefore on cell viability and vitality.

#### Membrane potential

DiBAC<sub>4</sub>(3), widely called oxonol, which measures membrane potential, has been proposed as a potential vitality dye (Lloyd and Hayes, 1995).

#### Yeasts

Sterols in yeast are synthesized by enzymes located in the endoplasmic reticulum membrane and are enriched in the plasma membrane where the final form of the yeast sterol, mainly ergosterol, is able to maintain the permeability barrier of the membrane (Dupont et al., 2011; Haines, 2001). Kobayashi et al. (2007) used oxonol for fermentation monitoring by *Saccharomyces carlsbergensis* in synthetic medium. In this study, the total population of yeasts were separated into two groups: one with high fluorescence intensity (cells with a depolarized

membrane, i.e. dying cells) and the other with low fluorescence intensity (cells with polarized membranes, i.e. live cells).

### Bacteria

Regarding bacteria, Salema et al. (1996) demonstrated that MLF performed by *O. oeni* generated an electrical potential gradient which controls the fermentation rate. Malate influx led to an increase of the negative charges in the cell, subsequently improving membrane polarization (Loubiere et al., 1992; Salema et al., 1994, 1996). The latter decreased at the end of MLF when malate was exhausted in the medium and thus when malate influx was lower. Bouix and Ghorbal (2013) used a DiBAC<sub>4</sub>(3) probe to demonstrate that increased cell polarization leads to a decrease in MLF lag time in growth medium. Thus, redox membrane potential is an important parameter in wine production. Salma et al. (2012) also used this dye as a marker of metabolic stress since the electron system across the cell membrane was disrupted.

### Intracellular reactive oxygen species (ROS)

Intracellular reactive oxygen species accumulation can be monitored by MitoTracker<sup>®</sup> Red H<sub>2</sub>-CMX Ros dye (Molecular Probes<sup>™</sup>) which is sensitive to overall cellular ROS, and by dihydroethidium (DHE), which is sensitive to superoxide anions but considered as a minor contributor to overall ROS (Mendes-Ferreira et al., 2010). Nutritional and environmental stresses, such as nitrogen depletion, led to ROS accumulation in cells and affected synthetic must fermentation (Mendes-Ferreira et al., 2010). These authors showed a close relationship between the increase of reactive oxygen species accumulation and the negative effects on cell membrane integrity. Therefore, MitoTracker<sup>®</sup> Red H<sub>2</sub>-CMX Ros and DHE dyes may be predictive markers of fermentation problems. Another dye, dehydrorhodamine (DHR), which was converted to the fluorescent compound Rhodamine 123 (Rh123) through interaction with ROS (Henderson and Chappell, 1993), was also used in the fermentation monitoring of *S. carlsbergensis* in synthetic beer must medium (Kobayashi et al., 2007).

### Intracellular lipid content

Inspired by the work of Greenspan et al. (1985), Mannazzu et al. (2008) developed a method to determine the intracellular neutral lipid concentration in FCM by Nile Red during fermentation in synthetic must medium performed by *S. cerevisiae*. The formation of lipid granules may be considered as a survival mechanism involved in the detoxification of excess sterols, sterol

precursors and/or fatty acids, which could cause membrane perturbations (Müllner and Daum, 2004). Oxygen starvation during AF inhibits the synthesis of certain sterols and lipids, thus FCM can be used to determine oxygen deficiency.

### Intracellular pH

Intracellular pH ( $\text{pH}_{\text{in}}$ ) is an important parameter due to its implication in physiological and metabolic functions like  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  equilibrium and ATPase and enzymatic activities (Bouix and Ghorbal, 2015; Orij et al., 2009). Thus, a perturbation in  $\text{pH}_{\text{in}}$  could lead to a disruption in cell growth and thus to stuck fermentations. To measure cell  $\text{pH}_{\text{in}}$ , Bouix and Ghorbal (2015) established a calibration curve with two probes to cover a wide range of pH. 5,6 carboxy 2',7' dichlorofluorescein diacetate (CDCF) was used for pH values ranging from 3 to 4.5 and 5,6 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (cFDA-SE) was used for pH values ranging from 4 to 7. These authors highlighted that *O. oeni* with a  $\text{pH}_{\text{in}}$  of 5.9 or 3.2 led to a lag time of 4 h to 120 h in synthetic medium, respectively, and 24 h to 504 h in white wine, respectively. Higher vitality,  $\text{pH}_{\text{in}}$  and polarization of inoculated cells, led to shorter MLF lag time. Thus, flow cytometry is a fast method for measuring the  $\text{pH}_{\text{in}}$  of *O. oeni* which governs MLF efficiency.

### *Specific enumeration of wine microorganisms*

#### Using specific antibodies

The use of flow cytometry is not limited to staining procedures with fluorescent dyes like those described above. Rodriguez and Thornton (2008) developed a method to distinguish and quantify *S. cerevisiae* from other yeasts such as the genus *Hanseniaspora* in natural must fermentation. First, they incubated grape must with an anti-*Saccharomyces* polyclonal antibody and then a second incubation was performed with a secondary antibody coupled with Alexa Fluor® 488 before FCM analysis. Rodriguez and Thornton (2008) developed a green fluorescent polyclonal antibody for *O. oeni* discrimination used with PI to monitor MLF performed simultaneously with AF in Chardonnay must. The authors considered bacteria with green fluorescence and without red fluorescence as viable *O. oeni* whereas Green<sup>+</sup> / Red<sup>+</sup> fluorescence reflected dead bacteria. However, no plate counts/ FCM comparison was performed. They concluded that viable and nonviable yeast and bacterial populations can be rapidly discriminated in simultaneous malolactic-alcoholic wine fermentations using antibodies, fluorescent dyes and FCM.

This method may be used to detect and quantify yeasts leading to wine spoilage. Indeed, the well-known spoilage yeast *B. bruxellensis* is one of the worst nightmares for winemakers. This yeast may be present in red wine and is able to produce several volatile compounds, like volatile phenols, responsible for off-flavors commonly called “Brett character” (Romano et al., 2008). *B. bruxellensis* can easily proliferate, despite the worst conditions in wine (Conterno et al., 2006). Thus *B. bruxellensis* detection and enumeration must be rapid and specific. Recently, an immunocytometry test has been developed (Chaillet et al., 2014) which consists in using an anti-*Brettanomyces* polyclonal antibody conjugated with a fluorochrome to specifically distinguish and quantify *Brettanomyces* among other yeast species with significant efficiency in synthetic medium. They confirmed their enumeration in wine and cider, thus *Brettanomyces* can be detected and quantified in less than two hours with this method.

#### Using Fluorescent in situ Hybridization (FISH)

The fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) technique may be coupled with FCM to specifically quantify wine microorganisms. FISH was used for several years (Wallner et al., 1993) but was mostly visualized by epifluorescence microscopy before being combined with FCM in the last decade (Inácio et al., 2003).

A fluorescent-labelled oligonucleotide probe designed to bind to a certain sequence of the 26S rRNA D1-D2 region allowed yeast specific staining since the D1-D2 region showed a high degree of species variation (Xufre et al., 2006). Thus, to hybridize a probe with the 26S rRNA sequence before FCM analysis, cells were permeabilized and then suspended in a hybridization buffer containing a small quantity of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), formamide, dextran sulfate or salmon sperm for example, before adding the fluorescent-labelled probe (Wallner et al., 1993). The first two chemical compounds improve the entry and the probe hybridization whereas the last two enhance the probe specificity. The FISH-FCM technique was validated by several authors such as Andorra et al. (2011) and Branco et al. (2012) who hybridized a specifically fluorescent-labelled probe in *S. cerevisiae* and *H. guilliermondii* to monitor fermentation in single and mixed culture directly in wine. Thus, they were able to discriminate both species in mixed fermentation due to the species-specific properties of the FISH probes. Similarly, the study conducted by Wang et al. (2014) presented three species-specific probes targeting the 26S rRNA D1-D2 region of *S. cerevisiae*, *H. uvarum* and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*). They demonstrated a suitable distinction between those species during fermentation in mixed-culture and co-inoculated wine. The FISH-FCM technique can also be used to detect and/or quantify spoilage yeasts. In this case, Serpaggi et

al. (2010) developed a FISH-FCM effective strategy to detect and quantify *B. bruxellensis* directly in red wine. They used the 26S-D.brux.5.1 probe designed by Röder et al. (2007) and obtained good correlation between FCM and plate counting in a selective medium.

#### Using fluorescent strains of microorganisms

Another method of monitoring a population in a mixed culture is to use a reporter gene, such as the *GFP* gene from *Aequorea victoria* coding for the green fluorescent protein (Gfp) (Niedenthal et al., 1996) which can be detected by FCM. *GFP* reporter construction in a yeast strain consists of a homologous recombination between a specific plasmid (with a specific cassette, like the kanMX cassette, allowing recombination) and the yeast genome, replacing a target gene by the *GFP* gene behind a promoter of interest. The amount of Gfp produced from this promoter can then be quantified in living yeast cells by FCM.

Consequently, the use of a strain with a GFP reporter in a mixed population during laboratory fermentation tended to generalize. Tesnière et al. (2013) used a *S. cerevisiae*-GFP strain in order to monitor yeast viability in synthetic must with different nitrogen contents. Kitagaki and Shimoi (2007) and Shiroma et al. (2014) described a method to monitor mitophagy during sake fermentation with a *S. cerevisiae* which exhibited a mitochondrion-GFP (called mito-GFP) informing on yeast fitness. Recently, Marsit et al. (2015) have constructed a *S. cerevisiae*-GFP strain to estimate cell viability with a double staining procedure (GFP/IP) during synthetic must fermentation, and more interestingly to differentiate this GFP-strain from another *S. cerevisiae* strain, mutated with a gene expressing a red fluorescent protein (t-dimer2) in medium.

Thus, the GFP reporter technique has been used for two decades with yeasts (Kahana et al., 1995; Niedenthal et al., 1996) and so is well-controlled, with a large choice of available plasmids for recombination, and can now be easily detected by FCM to monitor yeast fermentation.

#### **Perspectives: Other dyes used with wine yeasts and bacteria applicable to flow cytometry**

Another way to estimate cell viability is to use microscopy techniques, especially the Direct Epifluorescence Filter Technique (DEFT) which is in direct relation with FCM because the same dyes can be applied with these two methods (Davey and Hexley, 2011; Delobel et al., 2012; Wang, Esteve-Zarzoso et al., 2014). The main advantages exhibited by FCM are that it is more accurate, sensitive and, most importantly, less time-consuming. But many studies have used microscopy to determine fluorescence. Protocols have to be changed to adapt FCM analysis but the staining procedure is the same.

### Fluorescent dyes

#### Membrane fluidity

Membrane fluidity is known to be an important indicator of potentially disturbing environmental influences. Thus, monitoring membrane fluidity can give more detailed information on key aspects of cell responses to growth states. Tourdot-Maréchal et al. (2000) showed that membrane fluidity decreases when *O. oeni*, adapted to alcohol or not, is exposed to ethanol stress. Thus, ethanol increases permeability but not fluidity. Müller et al. (2000) studied this parameter with the 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) dye using FCM. Thus, yeasts and bacteria membrane fluidity in wine can be studied by flow cytometry.

#### Viable But Non Cultivable (VBNC) state

The results obtained by Millet and Lonvaud-Funel (2000) showed that the VBNC state of AAB was induced quickly by O<sub>2</sub> deprivation in red wine. Recovery from this cultivability was very rapid as soon as O<sub>2</sub> was available. For LAB, a similar state was induced by sulfite addition (Millet and Lonvaud-Funel, 2000). These results were based on the comparison of bacterial enumeration between plate counts and DEFT. The latter was performed using the Chemunex system in a red wine matrix. It is based on the hydrolysis of the substrate which generates fluorescence, so this dye is considered as a vitality dye and the method can be adapted to flow cytometry.

#### Using FISH for specific LAB and yeast identification and enumeration

Few studies have used oligonucleotide probes coupled to flow cytometry in wine. Stender et al. (2001) developed a FISH-based method by labelling a Peptid Nucleic Acid (PNA) probe coupled to fluorescein. The main difference between probes constituted of oligonucleotides or PNA is that the latter is not charged and penetrates more easily within cells.

### Yeasts

This fluorescein-labelled PNA probe was able to target a species-specific sequence of the 26S rRNA D1-D2 regions of *B. bruxellensis* isolates from wine samples. But the major drawback of this technique was its cost, which was very high in comparison to the classical FISH method. Nevertheless, the high specificity of the PNA-FISH technique means that it could be applied to other wine yeasts, and directly in wine for comparison with classic probes used in FISH techniques. *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *H. guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. thermotolerans*, *Pichia anomala*, *P. membranifaciens*, and *Torulasporea delbrueckii* isolated

from wine samples were discriminated by the FISH method coupled to epifluorescence (Xufre et al., 2006). The latter also designed a probe specific for *C. stellata* but this yeast emitted a fluorescence signal with the other probes tested.

### Bacteria

For wine bacteria, Blasco et al. (2003) referenced and developed specific probes for various species belonging to the LAB species present in must and wine: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Oenococcus*. Visualization was performed by fluorescent microscopy. This work referenced fourteen probes specifically for *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. collinoides*, *L. coryniformis*, *L. farciminis*, *L. hilgardii*, *L. mali*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. zae*, *Leuconostoc* sp., *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. parvulus* and, *O. oeni*. Detection of these probes, and so of these bacteria, may be performed by FCM after adapting the hybridization protocol.

### Other interesting “future” techniques

As demonstrated above, FCM techniques have been used successfully for several years with both bacteria and yeasts to monitor vitality, viability and other cell parameters during AF and MLF. FCM is also a good technique for measuring leavening viability, with fermentations performed before the inoculation of grape must (Díaz et al., 2010). However, other techniques are available in addition to classic FCM. Fluorescence Activated Cell-Sorting (FACS) has been known for several decades (Fulwyler, 1965) and is complementary to FCM. Firstly, this technique is similar to classical FCM, but after the passage of cells through the laser beam they are fractioned into droplets (containing only one cell) by ultrasonic vibrations, after which an electric charge is applied to each droplet according to their fluorescence intensity (threshold determined by the user) (Julius et al., 1972). Thus, each droplet is separated according to its electric charge in an electrostatic field and collected individually. The FACS technique is often used in the clinical field for cardio-vascular diseases (Gibson et al., 2004), cancer stem cell identification (Wang, Chen et al., 2014) and immune system studies (Shroff et al., 1995). Nevertheless, some publications have reported using FACS for bacteria, like *Escherichia coli* (Fuchs et al., 1996) and aquatic bacteria (Tada and Grossart, 2014). The cells are separated according to their fluorescence intensity for further analysis. In laboratory studies, FISH coupled with FACS could be used to separate a specific subpopulation within a whole microorganism population.

As described above, cell detection and enumeration by immunocytochemistry work well with both yeasts and bacteria (Rodriguez and Thornton, 2008b), but the major drawbacks of using



antibodies are their very high cost and their low stability. Thus, new small oligonucleotides, called aptamers, were designed in the 1990s and were found to be able to bind with both high specificity and affinity to a ligand on the cell surface (Ellington and Szostak, 1990; Jayasena, 1999; Toulmé and Giegé, 1998). A specific process for synthesizing these aptamers was developed, called systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) (Meyer et al., 2013). Nowadays, aptamers are primarily used as fluorescent probes in clinical diagnosis. Indeed, aptamers are currently available for use against pathogenic bacteria, such as anti-*Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* aptamers. In addition, aptamers and FACS can be coupled to select and separate aptamers of interest, using fluorescently labeled nucleic acids during the cell-SELEX process (Moon et al., 2014), portending a possible application in wine for the separation of microorganisms of interest. Thus, aptamers could be a very interesting tool in wine for detecting and quantifying specific microorganisms during AF and MLF by FCM or FACS.

Acetic acid bacteria are considered to be spoilage bacteria in winemaking, and their growth results in the oxidation of ethanol to acetic acid (acetification process). Thus, the detection and enumeration of AAB during wine production are important to better understand AAB population dynamics, as well as to maintain the quality of the final product. Torija et al. (2010) and Valera et al. (2013) developed AAB specific TaqMan probes to detect and quantify these bacteria using qPCR, but this technique is expensive and quite fastidious, as described above. Therefore, the FISH technique may be the key to this problem with the development of AAB specific fluorescent probes to differentiate these bacteria from LAB, like *O. oeni*. Probes may be coupled directly to fluorescent dye or to horseradish peroxidase (HRP) to amplify fluorescent signals, using tyramide coupled to fluorescent dye. The latter is accumulated in the cells after release (Yamaguchi et al., 2015). High fluorescence is required to discriminate bacteria from background noise.

Another interesting technique based on fluorescence is the use of Quantum Dots (QDs). QDs are semiconductor nanocrystals with an inorganic core. They are able to absorb light over a very broad spectral range (Dabbousi et al., 1995; Mattoussi et al., 2000; West and Halas, 2000) and have narrow photoluminescence spectra dependent on their diameters (Bagalkot et al., 2007; West and Halas, 2000). Moreover, they have good stability, a high photobleaching threshold and a QD mix can be excited by a single laser wavelength with different emission wavelengths, making them interesting for FCM analysis. They conjugate with molecules that bind to the target cells for direct use in biological and clinical studies. Nowadays, QDs are used in conjugation with aptamers (Duan et al., 2013) or antibodies (Han et al., 2015) and detected

by FCM. Indeed, Wang et al. (2015) have constructed antibody-QDs conjugate probes able to bind to three food pathogenic bacteria, i.e. *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, with high sensitivity and specificity, allowing rapid and species-specific detection of these microorganisms by fluorescent microscopy in the same food sample, based on QD properties. A study by Duan et al. (2013) showed aptamer-QDs conjugate as probes capable of binding to pathogenic bacteria like *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella* Typhimurium, allowing species-specific detection by FCM. Therefore, aptamers and antibodies are very interesting tools, and when conjugated with QDs could be a highly specific and sensitive technique for precisely detecting and quantifying microorganisms in must fermentation or directly in finished wine by FCM analysis.

Nevertheless, with the constant evolution of technologies, promising new FCM techniques are emerging and include Mass Cytometry (also called Cy-TOF), Imaging Flow Cytometry and, more recently, Spectral Cytometry. All these promising Flow Cytometry based-techniques will offer better precision, specificity and multiple analyses of the same wine sample.

### Acknowledgments

This work was supported by the Regional Council of Burgundy, the Interprofessional Office of Burgundy Wines and the Ministry of Higher Education and Research. The authors would also like to thank Juliane Mouries for her graphical assistance.

### References

- Adam, G., Duncan, H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33, 943–951.
- Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C., 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 124, 17–22.
- Amor, K.B., Breeuwer, P., Verbaarschot, P., Rombouts, F.M., Akkermans, A.D.L., Vos, W.M.D., Abee, T., 2002. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5209–5216.
- Andorra, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., Mas, A., 2011. Analysis and direct enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence *in situ* hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. *Food Microbiol.* 28, 1483–1491.
- Bagalkot, V., Zhang, L., Levy-Nissenbaum, E., Jon, S., Kantoff, P.W., Langer, R., Farokhzad, O.C., 2007. Quantum dot–aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer. *Nano Lett.* 7, 3065–3070.
- Blasco, L., Ferrer, S., Pardo, I., 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 225, 115–123.
- Bouchez, J. C., Cornu, M., Danzart, M., Leveau, J. Y., Duchiron, F., Bouix, M., 2004. Physiological significance of the cytometric distribution of fluorescent yeasts after viability staining. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 520–530.
- Bouix, M., Ghorbal, S., 2015. Rapid assessment of *Oenococcus oeni* activity by measuring intracellular pH and membrane potential by flow cytometry, and its application to the more effective control of malolactic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 193, 139–146.

- Bouix, M., Ghorbal, S., 2013. Rapid enumeration of *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation by flow cytometry. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1075–1081.
- Bouix, M., Leveau, J.-Y., 2001. Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation. *J. Inst. Brew.* 107, 217–225.
- Branco, P., Monteiro, M., Moura, P., Albergaria, H., 2012. Survival rate of wine-related yeasts during alcoholic fermentation assessed by direct live/dead staining combined with fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* 158, 49–57.
- Bruetschy, A., Laurent, M., Jacquet, R., 1994. Use of flow cytometry in oenology to analyse yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.* 18, 343–345.
- Chaillat, L., Martin, G., Genty, V., 2014. Mise au point d'une méthode de détection des *Brettanomyces* par immunocytométrie. Personal communication in SFI-AFC Congress.
- Chaney, D., Rodriguez, S., Fugelsang, K., Thornton, R., 2006. Managing high-density commercial scale wine fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 100, 689–698.
- Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Henick-Kling, T., Bisson, L.F., 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 139–147.
- Dabbousi, B.O., Bawendi, M.G., Onitsuka, O., Rubner, M.F., 1995. Electroluminescence from CdSe quantum-dot/polymer composites. *Appl. Phys. Lett.* 66, 1316–1318.
- Da Silveira, M.G., Romão, M.V.S., Loureiro-Dias, M.C., Rombouts, F.M., Abee, T., 2002. Flow cytometric assessment of membrane integrity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6087–6093.
- Davey, H.M., Hexley, P., 2011. Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environ. Microbiol.* 13, 163–171.
- Delobel, P., Pradal, M., Blondin, B., Tesniere, C., 2012. A “fragile cell” sub-population revealed during cytometric assessment of *Saccharomyces cerevisiae* viability in lipid-limited alcoholic fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 338–344.
- Diaper, J. p., Edwards, C., 1994. The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 221–228.
- Díaz, M., Herrero, M., García, L.A., Quirós, C., 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem. Eng. J.*, Invited Review Issue 2010 48, 385–407.
- Divol, B., Lonvaud-Funel, A., 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *J. Appl. Microbiol.* 99, 85–93.
- Duan, N., Wu, S., Yu, Y., Ma, X., Xia, Y., Chen, X., Huang, Y., Wang, Z., 2013. A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium* using aptamer conjugated quantum dots as labels. *Anal. Chim. Acta* 804, 151–158.
- Dupont, S., Beney, L., Ferreira, T., Gervais, P., 2011. Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1808, 1520–1528.
- Ellington, A.D., Szostak, J.W., 1990. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818–822.
- Farthing, J.B., Rodriguez, S.B., Thornton, R.J., 2007. Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* populations in high-sugar Chardonnay fermentations. *J. Sci. Food Agric.* 87, 527–533.
- Fernandes, R.L., Carlquist, M., Lundin, L., Heins, A.L., Dutta, A., Sørensen, S.J., Jensen, A.D., Nopens, I., Lantz, A.E., Gernaey, K.V., 2013. Cell mass and cell cycle dynamics of an asynchronous budding yeast population: Experimental observations, flow cytometry data analysis, and multi-scale modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 812–826.
- Fuchs, P., Weichel, W., Dübel, S., Breitling, F., Little, M., 1996. Separation of *E. coli* expressing functional cell-wall bound antibody fragments by FACS. *Immunotechnology* 2, 97–102.
- Fulwyler, M.J., 1965. Electronic separation of biological cells by volume. *Science* 150, 910–911.
- Gant, V.A., Warnes, G., Phillips, I., Savidge, G.F., 1993. The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. *J. Med. Microbiol.* 39, 147–154.
- Gerbaux, V., Thomas, J., 2009. Utilisations pratiques de ma cytométrie de flux pour le suivi des levures en œnologie. *Rev. Fr. Oenologie* 8–13.
- Gibson, F.C., Hong, C., Chou, H.H., Yumoto, H., Chen, J., Lien, E., Wong, J., Genco, C.A., 2004. Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 109, 2801–2806.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., Fowler, S.D., 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* 100, 965–973.

- Guillamón, J.M., Mas, A., 2011. Chapter 9 - Acetic Acid Bacteria, in: Carrascosa, A.V., Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 227–255.
- Haines, T.H., 2001. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog. Lipid Res.* 40, 299–324.
- Han, H.S., Niemeyer, E., Huang, Y., Kamoun, W.S., Martin, J.D., Bhaumik, J., Chen, Y., Roberge, S., Cui, J., Martin, M.R., Fukumura, D., Jain, R.K., Bawendi, M.G., Duda, D.G., 2015. Quantum dot/antibody conjugates for in vivo cytometric imaging in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 1350–1355.
- Henderson, L.M., Chappell, J.B., 1993. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur. J. Biochem.* 217, 973–980.
- Henry-Stanley, M.J., Garni, R.M., Wells, C.L., 2004. Adaptation of FUN-1 and Calcofluor white stains to assess the ability of viable and nonviable yeast to adhere to and be internalized by cultured mammalian cells. *J. Microbiol. Methods* 59, 289–292.
- Henschke, P. A., and V. Jiranek. 1993. Yeast: metabolism of nitrogen compounds, p. 77–165. In G. H. Fleet (ed.), *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic, Chur, Switzerland.
- Herrero, M., Quirós, C., García, L.A., Díaz, M., 2006. Use of flow cytometry to follow the physiological states of microorganisms in cider fermentation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6725–6733.
- Inácio, J., Behrens, S., Fuchs, B.M., Fonseca, Á., Spencer-Martins, I., Amann, R., 2003. *In situ* accessibility of *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA to Cy3-labeled oligonucleotide probes comprising the D1 and D2 domains. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2899–2905.
- Jayakody, L.N., Kadowaki, M., Tsuge, K., Horie, K., Suzuki, A., Hayashi, N., Kitagaki, H., 2014. SUMO expression shortens the lag phase of *Saccharomyces cerevisiae* yeast growth caused by complex interactive effects of major mixed fermentation inhibitors found in hot-compressed water-treated lignocellulosic hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 501–515.
- Jayasena, S.D., 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* 45, 1628–1650.
- Julius, M.H., Masuda, T., Herzenberg, L.A., 1972. Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 1934–1938.
- Kahana, J.A., Schnapp, B.J., Silver, P.A., 1995. Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9707–9711.
- Kitagaki, H., Shimoi, H., 2007. Mitochondrial dynamics of yeast during sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 227–230.
- Kobayashi, M., Shimizu, H., Shioya, S., 2007. Physiological analysis of yeast cells by flow cytometry during serial-repitching of low-malt beer fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 451–456.
- Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D., Mannazzu, I., 2008. ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1780, 892–898.
- Lloyd, D., Hayes, A.J., 1995. Vigour, vitality and viability of microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 133, 1–7.
- Longobardi-Givan, A., 2001. *Flow cytometry: first principles*, second ed. John Wiley & Sons, New York.
- Loubiere, P., Salou, P., Leroy, M.J., Lindley, N.D., Pareilleux, A., 1992. Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. *J. Bacteriol.* 174, 5302–5308.
- Malacrino, P., Zapparoli, G., Torriani, S., Dellaglio, F., 2001. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *J. Microbiol. Methods* 45, 127–134.
- Mannazzu, I., Angelozzi, D., Belviso, S., Budroni, M., Farris, G.A., Goffrini, P., Lodi, T., Marzona, M., Bardi, L., 2008. Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: Cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 84–91.
- Marsit, S., Mena, A., Bigey, F., Sauvage, F.-X., Couloux, A., Guy, J., Legras, J.-L., Barrio, E., Dequin, S., Galeote, V., 2015. Evolutionary advantage conferred by an Eukaryote-to-Eukaryote gene transfer event in wine yeasts. *Mol. Biol. Evol.* 32, 1695–1707.
- Mason, D.J., Shanmuganathan, S., Mortimer, F.C., Gant, V.A., 1998. A fluorescent gram stain for flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2681–2685.

- Mattoussi, H., Mauro, J.M., Goldman, E.R., Anderson, G.P., Sundar, V.C., Mikulec, F.V., Bawendi, M.G., 2000. Self-assembly of CdSe–ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12142–12150.
- Mendes-Ferreira, A., Sampaio-Marques, B., Barbosa, C., Rodrigues, F., Costa, V., Mendes-Faia, A., Ludovico, P., Leão, C., 2010. Accumulation of non-superoxide anion reactive oxygen species mediates nitrogen-limited alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7918–7924.
- Meyer, M., Scheper, T., Walter, J.-G., 2013. Aptamers: versatile probes for flow cytometry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7097–7109.
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 136–141.
- Monthéard, J., Garcier, S., Lombard, E., Cameleyre, X., Guillouet, S., Molina-Jouve, C., Alfenore, S., 2012. Assessment of *Candida shehatae* viability by flow cytometry and fluorescent probes. *J. Microbiol. Methods* 91, 8–13.
- Moon, J.-H., Kim, G., Park, S.B., Lim, J., Mo, C., 2014. The importance of FACS analysis in the development of aptamers specific to pathogens. *J. Biosyst. Eng.* 39, 111–114.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., Suárez, J.A., 2003. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4084–4088.
- Müller, S., Ullrich, S., Lösche, A., Loffhagen, N., Babel, W., 2000. Flow cytometric techniques to characterise physiological states of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Microbiol. Methods* 40, 67–77.
- Müllner, H., Daum, G., 2004. Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim. Pol.* 51, 323–347.
- Muñoz, R., Moreno-Arribas, M.V., Rivas, B. de las, 2011. Chapter 8 - Lactic Acid Bacteria, in: Carrascosa, A.V., Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 191–226.
- Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M., Hegemann, J.H., 1996. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* 12, 773–786.
- Oliver, J.D., 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43, 93–100.
- O’Neill, K., Aghaeepour, N., Špidlen, J., Brinkman, R., 2013. Flow cytometry bioinformatics. *PLoS Comput Biol* 9, e1003365.
- Orij, R., Postmus, J., Ter Beek, A., Brul, S., Smits, G.J., 2009. *In vivo* measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology* 155, 268–278.
- Prosperi, E., Croce, A.C., Bottiroli, G., Supino, R., 1986. Flow cytometric analysis of membrane permeability properties influencing intracellular accumulation and efflux of fluorescein. *Cytometry* 7, 70–75.
- Quirós, C., Herrero, M., García, L.A., Díaz, M., 2009. Quantitative approach to determining the contribution of viable-but-nonculturable subpopulations to malolactic fermentation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2977–2981.
- Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J.M., Mayen, M., Merida, J., Medina, M., 2002. Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7432–7437.
- Röder, C., König, H., Fröhlich, J., 2007. Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Res.* 7, 1013–1026.
- Rodriguez, S.B., Thornton, R.J., 2008. Use of flow cytometry with fluorescent antibodies in real-time monitoring of simultaneously inoculated alcoholic-malolactic fermentation of Chardonnay. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 38–42.
- Romano, A., Perello, M.C., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1577–1585.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., Rasmussen, O.F., 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 37–45.
- Roth, B.L., Poot, M., Yue, S.T., Millard, P.J., 1997. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2421–2431.
- Salema, M., Capucho, I., Poolman, B., Romão, M.V.S., Dias, M.C., 1996. *In vitro* reassembly of the malolactic fermentation pathway of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*). *J. Bacteriol.* 178, 5537–5539.
- Salema, M., Poolman, B., Lolkema, J.S., Dias, M.C.L., Konings, W.N., 1994. Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc Oenos*. *Eur. J. Biochem.* 225, 289–295.
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., 2012. Cytofluorometric detection of wine lactic acid bacteria: application of malolactic fermentation to the monitoring. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 63–73.
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Divol, B., Alexandre, H., 2013. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 8, e77600.

- Serpaggi, V., Remize, F., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., 2010. Specific identification and enumeration of the spoilage microorganism *Brettanomyces* in wine by flow cytometry: A useful tool for winemakers. *Cytometry A* 77A, 497–499.
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., 2012. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiol.* 30, 438–447.
- Shapiro, H.M., 2003. *Practical Flow Cytometry*, 4<sup>th</sup> Edition. John Wiley & Sons. Inc. Hoboken. New Jersey.
- Shiroma, S., Jayakody, L.N., Horie, K., Okamoto, K., Kitagaki, H., 2014. Enhancement of ethanol fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast by disrupting mitophagy function. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1002–1012.
- Shroff, K.E., Meslin, K., Cebra, J.J., 1995. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect. Immun.* 63, 3904–3913.
- Steensels, J., Meersman, E., Snoek, T., Saels, V., Verstrepen, K.J., 2014. Large-scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6965–6975.
- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J.J., Sørensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., Perry-O’Keefe, H., Sage, A., Young, B., Coull, J., 2001. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 938–941.
- Tada, Y., Grossart, H.-P., 2014. Community shifts of actively growing lake bacteria after N-acetyl-glucosamine addition: improving the BrdU-FACS method. *ISME J.* 8, 441–454.
- Tesnière, C., Delobel, P., Pradal, M., Blondin, B., 2013. Impact of nutrient imbalance on wine alcoholic fermentations: nitrogen excess enhances yeast cell death in lipid-limited must. *PLoS ONE* 8, e61645.
- Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., Mas, A., 2010. Identification and enumeration of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan–MGB probes. *Food Microbiol.* 27, 257–265.
- Toulmé, J., Giegé, R., 1998. Les aptamères : des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection *in vitro*. *Médecine/Sciences* 14, 155.
- Tourdot-Maréchal, R., Gaboriau, D., Beney, L., Diviès, C., 2000. Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 269–273.
- Valera, M.J., Torija, M.J., Mas, A., Mateo, E., 2013. *Acetobacter malorum* and *Acetobacter cerevisiae* identification and enumeration by Real-Time PCR with TaqMan-MGB probes. *Food Microbiol.* 36, 30–39.
- Wallner, G., Amann, R., Beisker, W., 1993. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136–143.
- Walther, A., Hesselbart, A., Wendland, J., 2014. Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world’s first pure culture lager yeast. *G3 Genes Genomes Genetics* 4, 783–793.
- Wang, A., Chen, L., Pu, K., Zhu, Y., 2014. Identification of stem-like cells in non-small cell lung cancer cells with specific peptides. *Cancer Lett.* 351, 100–107.
- Wang, B., Wang, Q., Cai, Z., Ma, M., 2015. Simultaneous, rapid and sensitive detection of three food-borne pathogenic bacteria using multicolor quantum dot probes based on multiplex fluoroimmunoassay in food samples. *LWT - Food Sci. Technol.* 61, 368–376.
- Wang, C., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., 2014a. Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) populations during alcoholic fermentation by fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* 191, 1–9.
- West, J.L., Halas, N.J., 2000. Applications of nanotechnology to biotechnology: Commentary. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 215–217.
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741.
- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-Martins, I., Gírio, F., 2006. Application of fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 376–384.
- Yamaguchi, T., Kawakami, S., Hatamoto, M., Imachi, H., Takahashi, M., Araki, N., Yamaguchi, T., Kubota, K., 2015. *In situ* DNA-hybridization chain reaction (HCR): a facilitated *in situ* HCR system for the detection of environmental microorganisms. *Environ. Microbiol.* 17, 2532–2541.

## Matériels et méthodes

### 1. Souches de levures utilisées

Trois souches de *S. cerevisiae* ont été utilisées lors de cette thèse : la souche commerciale *S. cerevisiae* Fermol PB-2023 (AEB France), la souche *S. cerevisiae* 59A (MATa ho *AMNI::kanMX4*, dérivé haploïde de la souche commerciale *S. cerevisiae* EC1118) et la souche *S. cerevisiae* 59A-GFP (MATa ho *AMNI::TEF2Pr-GFP-ADH1-NATMX4*) exprimant une enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP S65T) permettant la discrimination *S. cerevisiae* / non-*Saccharomyces* par cytométrie en flux. Les souches 59A et 59A-GFP ont toutes deux été fournies par l'INRA/SupAgro de Montpellier (Marsit et al., 2015).

En ce qui concerne les non-*Saccharomyces*, deux souches d'intérêt œnologique ont été utilisées : *Lachancea thermotolerans* BB7-FA20 et *Starmerella bacillaris* MCR-9, isolées et identifiées précédemment au laboratoire sur baie de raisin de Bourgogne (Sadoudi, 2014).

### 2. Conditions de culture

Toutes les souches de levures ont été cultivées à 28 °C dans du milieu YPD modifié : 20 g.L<sup>-1</sup> glucose (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 10 g.L<sup>-1</sup> peptone (Biokar) et 5 g.L<sup>-1</sup> extrait de levure (Biokar) avec 18 g.L<sup>-1</sup> d'agar (Biokar) pour du milieu solide sur boîtes de Petri, supplémenté avec 0,1 g.L<sup>-1</sup> de chloramphénicol (anti-bactérien) puis stérilisé par autoclave (20 min à 121°C). Pour l'inoculation des fermentations, des pré-cultures de 150 mL de milieu YPD modifié ont été réalisées en Erlenmeyer de 250 mL stérilisés par autoclave (20 min à 121°C), fermés avec du coton cardé et incubées à 28 °C pendant 24 ou 48 h avec agitation (120 rpm).

### 3. Conditions de fermentations

Les fermentations alcooliques ont été effectuées soit en jus de raisin blanc commercial (Raisin blanc et muscat, Groupe Casino) soit en moût de raisin blanc (mélange de plusieurs cépages). Le jus de raisin commercial est naturellement composé de 80 g.L<sup>-1</sup> de glucose et 80 g.L<sup>-1</sup> de fructose. Afin de se rapprocher des conditions réelles d'un moût, ce jus a été supplémenté avec 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose et 30 g.L<sup>-1</sup> de fructose pour atteindre une concentration totale en sucre entre 200 et 210 g.L<sup>-1</sup> (jus de raisin standardisé). La concentration en azote assimilable est d'environ 170 mg.L<sup>-1</sup>. Avant inoculation, le jus a été stérilisé par filtration sur filtre à membrane de cellulose avec des pores de 0,22 µm (Stericup-GP, MERCK-Millipore). Le moût de raisin blanc utilisé présentait une concentration en sucres totaux de 212 g.L<sup>-1</sup> et en

azote assimilable de 251 mg.L<sup>-1</sup>. Avant inoculation, le moût a été centrifugé à 7 000 g pendant 7 min à 4 °C pour éliminer les débris ainsi que les microorganismes présents.

Les fermentations ont été effectuées en Erlenmeyer stérile de 250 mL avec 200 mL de jus de raisin standardisé, en éprouvette graduée de 1 L avec 800 mL de moût ainsi qu'en éprouvette graduée de 2 L avec 1,8 L de moût.

Trois types de fermentations ont été effectués :

- Fermentation pure : une seule souche de levure a été inoculée dans 200 mL de jus de raisin standardisé ou 800 mL de moût à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> à partir d'une pré-culture en milieu YPD modifié.
- Fermentation séquentielle : une souche de non-*Saccharomyces* et une souche de *S. cerevisiae* ont été inoculées dans 200 mL de jus de raisin standardisé ou 1,8 L de moût à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> à partir d'une pré-culture en milieu YPD modifié, avec un délai d'inoculation pour *S. cerevisiae* de 24 ou 48 h après ensemencement de la levure non-*Saccharomyces*.
- Fermentation séquentielle avec membrane de dialyse : principe similaire à la fermentation séquentielle excepté la séparation physique des souches par une membrane de dialyse (Spectra/por, Spectrum Labs, MWCO 12-14 kDa, diamètre de 48 mm, longueur 60 cm). La membrane a été remplie avec 600 mL de moût et l'éprouvette avec 1,2 L de moût. La souche de non-*Saccharomyces* a été inoculée dans la membrane alors que la souche de *S. cerevisiae* a été inoculée à l'extérieur de la membrane 24 ou 48 h après la non-*Saccharomyces*, toutes deux à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> à partir d'une pré-culture en milieu YPD modifié.

Des triplicats biologiques ont été effectués pour chaque condition de fermentation.



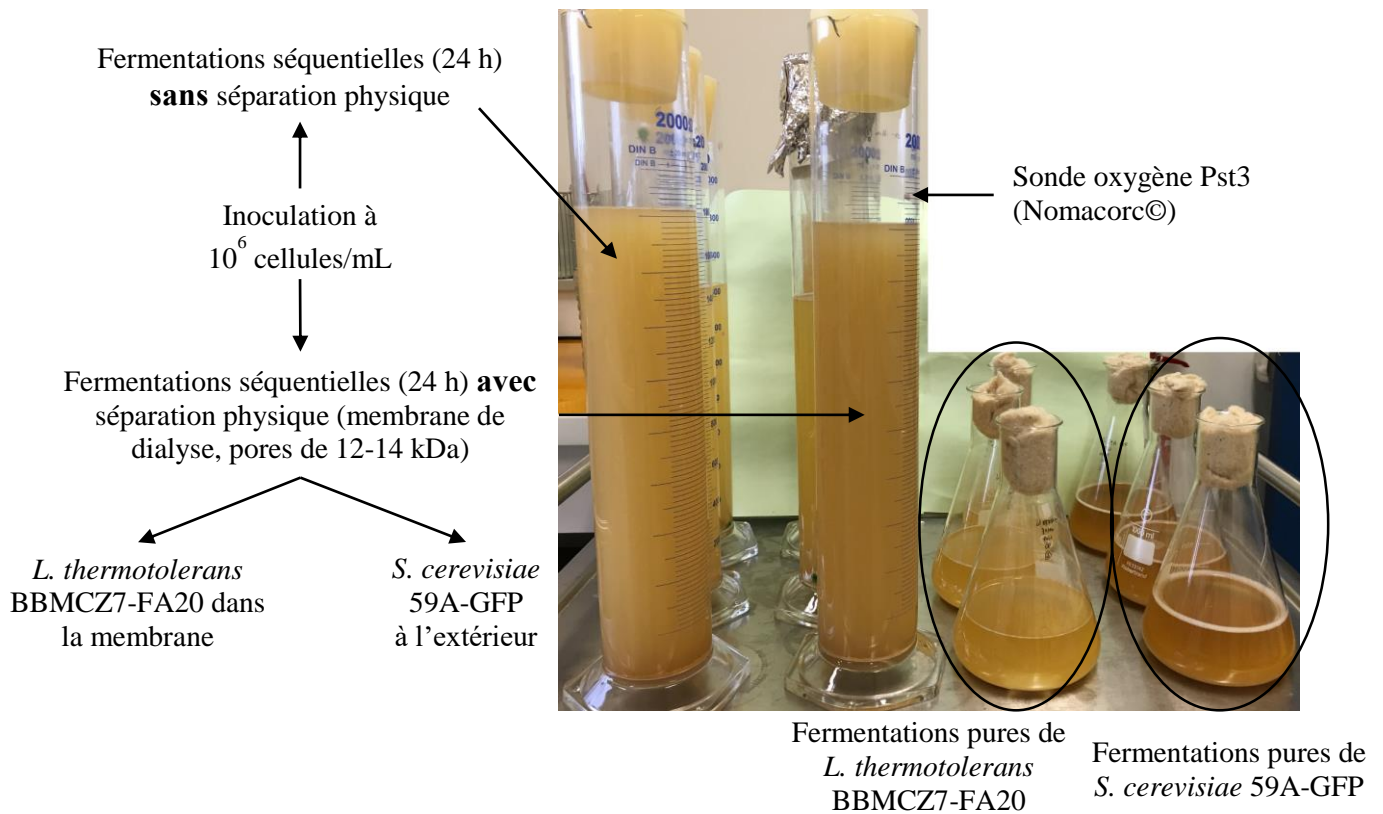


Figure 9 : Schéma représentant les conditions de fermentations avec le couple *L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20 / *S. cerevisiae* 59A-GFP

#### 4. Paramètres du cytomètre en flux

Les analyses de cytométrie en flux ont été réalisées avec un cytomètre BD Accuri C6 et les données ont été analysées avec le logiciel « BD Accuri C6 Software ». Pour chaque analyse, un seuil de détection de 80 000 en FSC a été utilisé et les axes FSC-H / SSC-H ont été paramétrés pour afficher des valeurs logarithmiques. 20  $\mu$ L d'échantillons ont été analysés avec un débit de 34  $\mu$ L/min en fixant une plage comprise entre 100 et 1000 événements/ $\mu$ L. Un laser à argon (longueur d'onde de 488 nm) a été utilisé pour exciter les cellules marquées ou non (autofluorescence) avec un fluorochrome. Trois filtres ont été utilisés pour détecter la fluorescence émise : le filtre FL1-H (530 $\pm$ 30 nm) pour la fluorescence verte, le filtre FL2-H (585 $\pm$ 40 nm) pour la fluorescence rouge/orangée et le filtre « long-pass » FL3-H (675 nm) pour la fluorescence rouge.

#### 5. Analyses physiologiques des levures par cytométrie en flux

Plusieurs fluorochromes ont été testés durant cette étude afin d'analyser la physiologie des levures au cours de la fermentation alcoolique, tous provenant du même fournisseur (Invitrogen,

Fisher Scientific, Illkirch, France). Le Tableau 1 récapitule les fluorochromes testés avec différentes conditions expérimentales.

Tableau 1 : récapitulatif des différents marqueurs testés lors de cette thèse, avec l'intérêt de chacun d'entre eux et les conditions ainsi que les souches utilisées.

Fluorochrome	Excitation/ émission maximum	Intérêt	Souche testée	Concentration finale	Temps d'incubation (min)	Température d'incubation (°C)	Tampon	Condition
<b>FUN-1</b>	480/530 nm	Viabilité et mortalité	<i>S. cerevisiae</i> PB2023	15 µM	30	28	PBS pH 7,4 + 2 % Glucose	Vivantes, mortes (traitement thermique à 95 °C pendant 15 min) et mélange vivantes/mortes 50/50
			<i>S. cerevisiae</i> 59A	15 µM	30	28	PBS pH 7,4 + 2 % Glucose	Vivantes, mortes (traitement thermique à 95 °C pendant 15 min) et mélange vivantes/mortes 50/50
<b>Rhodamine 123 (Rh123), DiHydroxyEthidium (DHE) et Mitotracker Red CMXRos (MR)</b>	Rh123 : 507/529 nm DHE : 500/580 nm MR : 579/599 nm	Marqueur oxydatif	<i>S. cerevisiae</i> PB2023	50 nM (Rh123), 31,7 µM (DHE), 200 nM (MR)	10 (Rh123, DHE) 20 (MR)	Ambiante (Rh123, DHE) 37 (MR)	PBS pH 7,4	Traitement oxydatif à l'eau oxygénée à 29,4, 294 ou 2940 mM pendant 30, 60, 90 min ou 120 min
			<i>S. cerevisiae</i> PB2023 (culture de 12 jours)	50 nM (Rh123), 31,7 µM (DHE), 200 nM (MR)	10 (Rh123, DHE) 20 (MR)	Ambiante (Rh123, DHE) 37 (MR)	PBS pH 7,4	Sans traitement oxydatif
<b>Mitotracker Red CMXRos</b>	579/599 nm	Marqueur oxydatif	<i>S. cerevisiae</i> PB2023 (culture de 19 jours)	50 ou 100 nM	20	37	PBS pH 7,4	Sans traitement oxydatif
<b>Nile Red</b>	552/636 nm	Accumulation de gouttelettes lipidiques	<i>S. cerevisiae</i> PB2023 (différent temps de cultures)	314 nM	0 à 35	Ambiante	PBS pH 7,4	Passage de l'échantillon toutes les minutes pour déterminer le temps d'incubation optimal
<b>carboxy-Fluoresceine DiAcetate (cFDA)</b>	490/525 nm	Vitalité	<i>S. bacillaris</i> MCR-9	45 µM	20	Ambiante	McIlvaine pH 4	optimisation du marquage pour cette souche en particulier
<b>Iodure de propidium (IP)</b>	538/617 nm	Intégrité membranaire	<i>L. thermotolerans</i> BB7-FA20 <i>S. bacillaris</i> MCR-9 <i>S. cerevisiae</i> 59A-GFP	1 µg/mL	10	Ambiante	PBS pH 7,4	Vivantes, mortes (traitement thermique à 95 °C pendant 15 min) et mélange vivantes/mortes 50/50 Suivi de viabilité sur boîtes YPD et IP en parallèle
<b>Annexin V, Alexa Fluor 488® conjugué Digestion paroi par zymolyase 20T</b>	495/519	Apoptose	<i>S. cerevisiae</i> PB2023 <i>L. thermotolerans</i> BBMCZ7-FA20	Zymolyase 20T entre 0,2 et 2 mg/mL	15	Ambiante	140 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> ; avec ou sans 1,2M sorbitol ; pH 7,4	Traitement oxydatif pour induire l'apoptose avec H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 mM
<b>carboxy-Fluoresceine DiAcetate Succinimidyl Ester (cFDA-SE)</b>	492/517	pH intracellulaire	<i>L. thermotolerans</i> BB7-FA20 <i>S. bacillaris</i> MCR-9 <i>S. cerevisiae</i> 59A-GFP	22,4 µM	15	Ambiante	100 mM MOPS ; 50 mM sodium succinate ; 500 mM acetate de sodium ; pH variable	Test en condition de fermentation alcoolique

Suite à ces tests, quatre fluorochromes ont été retenus : le carboxy-Fluoresceine DiAcetate (cFDA, longueurs d'ondes d'émission/excitation maximum 490/525 nm) pour la viabilité, l'iodure de propidium (IP, longueurs d'ondes d'émission/excitation maximum 538/617 nm) pour l'intégrité membranaire, le Nile Red (longueurs d'ondes d'émission/excitation maximum 552/636 nm) pour l'accumulation de gouttelettes lipidiques intracellulaires et le DiHydroxyEthidium (DHE, longueurs d'ondes d'émission/excitation maximum 500/580 nm) pour l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Le cFDA est une molécule non fluorescente pouvant traverser la membrane et qui est clivée par les estérases cellulaires pour libérer la carboxy-fluoresceine, molécule fluorescente dans le vert. Ainsi, le cFDA renseigne sur la viabilité des cellules. Le protocole utilisé a été le suivant : 1 mL de culture a été centrifugé à 12 000 g pendant 5 min à 10 °C. Le culot de levures a été repris dans 1 mL de tampon McIlvaine (100 mM acide citrique, 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4) et des dilutions en cascades au dixième de cette suspension cellulaire ont été préparées. La concentration cellulaire des différentes dilutions a ensuite été mesurée par cytométrie en flux. 100 µL de la dilution présentant entre 100 et 1000 évènements/µL au cytomètre ont été aliquotés et 3 µL de cFDA à 1500 µM en acétone ont été ajoutés. La préparation a été incubée 15 min à l'obscurité (20 min pour *S. bacillaris* MCR-9). Les échantillons ont ensuite été analysés par cytométrie en flux (filtre FL1-H).

L'iodure de propidium (IP) est une molécule qui ne peut pas passer la membrane plasmique des cellules si cette dernière est intacte. En revanche, en cas d'altération de cette membrane, ce fluorochrome peut pénétrer la cellule et venir se fixer sur l'ADN avec pour conséquence l'émission d'une fluorescence rouge. Il permet donc de détecter les cellules ayant une membrane altérée, ces cellules étant alors considérées comme mortes.

Le Nile Red est une molécule non fluorescente en milieu aqueux qui va venir se fixer sur les lipides membranaires (phospholipides) ou sur les lipides cytoplasmiques (gouttelettes lipidiques) et émettre une fluorescence rouge/orangée (Greenspan et al., 1985; Mannazzu et al., 2008; Müllner and Daum, 2004).

Le DiHydroEthidium (DHE) est une molécule qui peut être oxydée dans la cellule, libérant de l'éthidium capable de venir se fixer sur l'ADN et ainsi émettre une fluorescence rouge/orangée (Capusoni et al., 2016; Landolfo et al., 2008; Mendes-Ferreira et al., 2010). Le protocole utilisé pour ces trois fluorochromes a été le suivant : 1 mL de culture a été centrifugé à 12 000 g pendant 5 min à 10 °C. Le culot de levures a été repris dans 1 mL de Phosphate Buffer Saline (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, et 11,9 mM Phosphate, pH 7.2)(Fisher Scientific, Illkirch,

France). Des dilutions en cascades au dixième de cette suspension cellulaire ont été préparées. La concentration cellulaire des différentes dilutions a ensuite été mesurée par cytométrie en flux. Ensuite, trois aliquots ont été préparés pour le marquage à partir de la dilution présentant entre 100 et 1000 évènements/ $\mu\text{L}$  au cytomètre :

- 1  $\mu\text{L}$  d'IP à 0,1 mg/mL (en eau) a été ajouté à 100  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire puis incubé 10 min à l'obscurité avant analyse au cytomètre en flux (filtre FL3-H),
- 7  $\mu\text{L}$  de Nile Red à 31,4  $\mu\text{M}$  (dans l'acétone) ont été ajoutés à 700  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire puis incubé entre 5 et 10 min à l'obscurité avant analyse au cytomètre en flux (filtre FL2-H) (Greenspan et al., 1985; Sitepu et al., 2012),
- 1,28  $\mu\text{L}$  de DHE à 5 mM (dans du DiMéthylSulfOxide, DMSO) ont été ajoutés à 200  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire puis incubé 15 min à l'obscurité avant analyse au cytomètre en flux (filtre FL2-H) (Mendes-Ferreira et al., 2010).

## 6. Suivi des cinétiques fermentaires

Les fermentations ont été suivies au FOSS<sup>TM</sup> (OenoFOSS<sup>TM</sup>, FOSS, Hilleroed, Denmark) qui permet d'avoir plusieurs paramètres physico-chimiques du moût en fermentation en se basant sur la spectrométrie infra-rouge à transformée de Fourier. Pour cela, 200  $\mu\text{L}$  de moût ou de moût en fermentation centrifugés ont été analysés chaque jour de fermentation pour la quantité de sucres (glucose et fructose), le pourcentage d'éthanol et le pH. Ainsi, une cinétique fermentaire peut être établie en traçant les courbes [sucres]=f(temps) et % (v/v) Ethanol=f(temps).

## 7. Dosage de l'acide L-lactique, de l'oxygène dissout et des acides aminés

Un kit enzymatique de dosage de l'acide L-lactique a été utilisé (BioSenTec, Auzeville-Tolosane, France) pour mesurer la concentration en acide L-lactique contenue dans des échantillons de moûts en fermentation. Le protocole appliqué a été celui fourni par le fabricant. L'oxygène dissout dans le moût en fermentation a été mesuré dans les éprouvettes avec des pastilles Pst3 (Nomacorc©) préalablement collées au silicone à mi-hauteur des éprouvettes. Afin de lire la concentration en oxygène, le NomaSense<sup>TM</sup> O2 P300 (Nomacorc©) a été utilisé en suivant les instructions du fabricant. La concentration en oxygène dissout a été mesurée chaque jour de fermentation.

Avant de pouvoir doser les acides aminés et l'ammonium présent dans le moût, ces composés ont été dérivatisés en utilisant le kit « AccQTag™ Ultra Derivatization » (Waters, USA) en suivant les instructions du fabricant. La séparation des acides aminés et de l'ammonium a ensuite été réalisée par High Performance Liquid Chromatography (HPLC) avec une colonne à phase inverse C18 (AccQ-Tag™ Ultra Column, 3.9 × 150mm) suivie d'une détection fluorométrique. L'acide L-alpha-amino-n-butyrique à 0,1 mM a été ajouté aux échantillons comme standard interne (Ritt et al., 2009). Pour chaque échantillon, 1 µL a été injecté dans la colonne et la chambre a été maintenue à 37 °C. Le débit du tampon de migration (140 mM acétate de sodium trihydraté, 6,9 mM triéthylamine et 3,42 µM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA)) a été fixé à 1 mL/min. Chaque échantillon a été élué en appliquant un gradient spécifique (tableau 2).

Tableau 2 : gradient appliqué pour la séparation des acides aminés et de l'ammonium par HPLC

TEMPS (MIN)	TAMPON DE MIGRATION (%)	ACETONITRILE (%)	EAU (%)
0,0	100	0	0
1,0	100	0	0
1,5	99	1	0
16,5	97	3	0
25,5	94	6	0
35,5	86	14	0
51,5	86	14	0
52,0	0	60	40
55,0	0	60	40
55,5	100	0	0
66,5	100	0	0

## 8. Analyse transcriptomique

Lors des fermentations en éprouvettes avec membrane de dialyse, les ARN totaux de *L. thermotolerans* et *S. cerevisiae* ont été extraits en utilisant la méthode phénol/chloroforme. Les extractions ont été réalisées sur culots cellulaires, congelés à -80 °C et contenant 10<sup>8</sup> cellules, prélevés à trois temps différents pendant la fermentation alcoolique : 7 h, 24 h et 48 h. Pour les extractions, les cellules ont été lavées avec 1 mL d'eau « RNase free » (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) puis centrifugée à 12 000 g pendant 5 min à 4 °C. Le culot a été repris dans 1 mL de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) puis la suspension cellulaire a été transférée dans un microtube à vis (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany) contenant 300 mg de billes en verre de 0,5 mm de diamètre préalablement nettoyées à l'acide chlorhydrique et rincées à l'eau jusqu'à un pH neutre (Tilloy, 2013). La lyse des

cellules a été réalisée grâce à un Precellys® (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France), placé dans une chambre froide à 4°C, en appliquant trois cycles de 15 sec à 6 500 g avec 5 min de repos dans la glace entre chaque cycle. 200 µL de chloroforme anhydre (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ont ensuite été ajoutés et le tube vortexé 30 sec afin de former une émulsion. Le lysat a ensuite été centrifugé à 18 213 g pendant 15 min à 4 °C et la phase aqueuse a été prélevée avec précaution dans un nouveau microtube de 1,5 mL « RNase free » (MCT-150-C, Axygen®, Corning, Boulogne-Billancourt, France). Un volume de 2-propanol à -20 °C équivalent au volume d'échantillon prélevé a été ajouté et le lysat, placé dans la glace, a été agité toutes les deux min pendant 10 min puis centrifugé à 18 213 g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant a été éliminé et le culot d'ARN a été lavé deux fois avec 1 mL d'éthanol 70 % (v/v) (préparé avec de l'eau « RNase free » et de l'éthanol absolu) puis centrifugé à 18 213 g pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant a été éliminé et les microtubes ont été placés à l'envers bouchon ouvert à température ambiante afin d'évaporer l'éthanol restant pendant 15 minutes. Pour finir, le culot d'ARN a été repris dans 60 µL d'eau « RNase free » puis stocké à -80 °C. La concentration et la pureté des ARN ont été mesurées par spectrophotométrie en utilisant le ratio A260/A280 avec un lecteur de plaques Nanoquant Infinite M200 Pro (Tecan Trading AG, Switzerland). L'intégrité des ARN a été analysée avec un Agilent Bioanalyzer 2100 en utilisant le kit Agilent RNA 6000 nano (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) en suivant les instructions du fabricant.

## 9. Dosage des composés volatils

L'analyse des composés volatils a été réalisée en partenariat avec le laboratoire LiBiFOOD de l'université de Barcelone (Espagne) en utilisant la technique « HeadSpace-Solid Phase Micro Extraction-Gas Chromatography/Mass Spectrometry » (HS-SPME-GC/MS). La fibre de SPME est composée de divinylbenzène/carboxène/polydiméthylsiloxane 50/30 µm de 1 cm de long (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

2 mL d'échantillons (moût en fin de fermentation alcoolique, centrifugé 5 min à 12 000 g) ont été placés dans un vial de 10 mL, fermé par un septum en silicone, et placé dans un bain d'huile de silicone à 40 °C en maintenant une agitation magnétique dans les échantillons (300 rpm). Après 10 min, la fibre de SPME a été exposée pendant 30 min à l'espace de tête des échantillons puis immédiatement désorbée dans l'injecteur du chromatographe en phase gazeuse.

Les composés volatils ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse quadrupolaire utilisant un détecteur Agilent 5973 Network (Agilent

Technologies, Palo Alto, CA, USA). Les analytes ont été séparés par une colonne Supelcowax-10 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) de 60 m, 0,25 mm de diamètre interne et 0,25 µm d'épaisseur. La température de la colonne a été fixée à 40 °C pendant 10 min, augmentée à 200 °C avec un gradient de 3 °C/min puis à 150 °C et pour finir à 250 °C avec un gradient de 15 °C/min. La température de l'injecteur a été fixée à 260 °C et le temps de désorption de la fibre SPME dans l'injecteur a été fixée à 5 min. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1,5 mL/min. La température de la source d'ions a été fixée à 175 °C et la ligne de transfert à 280 °C. Les spectres de masse de l'impact des électrons ont été enregistrés à 70 eV avec 2 scan/s. L'analyse GC-MS a été réalisée avec le « complete scanning mode » (SCAN) avec une gamme de masses de 30-300 *m/z*.

L'identification des composés a été réalisée en comparant leur spectre de masse et leur temps de rétention avec ceux de standards ou ceux disponible dans la banque de spectre de masse Wiley 6 et dans la littérature. Les facteurs de réponse des composés volatils ont été calculés en utilisant une courbe de calibration obtenue en analysant une solution hydroalcoolique (éthanol 10 % (v/v)) avec différentes concentrations de composés de référence.

#### 10. Dosage des acides gras et des phytostérols

Deux étalons internes ont été ajoutés à 50 mL de moût : 250 µL d'acide heptadécanoïque C17:0 (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) à 1 mg/mL et 250 µL de cholestérol (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) à 1 mg/mL, tous deux dissouts dans de l'acétate d'éthyle. Le moût contenant les étalons internes a été transféré dans une ampoule à décanter de 150 mL et 25 mL de chloroforme ont été ajoutés. La solution a été agitée 4 fois puis laissée à décanter 15 min. Afin de casser l'émulsion formée au cours de la décantation, la phase organique a été remuée avec une baguette en verre préalablement lavée au chloroforme. La phase organique a ensuite été récoltée dans un erlenmeyer. L'extraction au chloroforme a été réalisée trois fois, les phases organiques ayant été récoltées dans le même récipient. Du sulfate de sodium anhydre a été ajouté afin d'éliminer les traces d'eau contenues dans la phase organique jusqu'à la présence de grains libres. Cette dernière a ensuite été transférée dans un ballon de 100 mL puis le solvant a été évaporé dans un évaporateur rotatif à température ambiante jusqu'à avoir environ 1 à 2 mL restants qui ont été transférés dans un vial ambré de 2 mL. Le solvant résiduel a été complètement évaporé sous flux d'azote et le vial stocké à 4 °C.

Les échantillons ont ensuite subi une saponification en ajoutant 900 µL d'éthanol absolu et 250 µL d'une solution aqueuse saturée de KOH dans chaque vial. Les échantillons ont ensuite été

agités à 250 rpm à température ambiante pendant 15 h. La solution a ensuite été transférée dans un tube à essai de 10 mL, le vial de 2 mL a été rincé deux fois avec 1 mL d'eau milliQ (Millipore) transféré dans le tube à essai. 2 mL d'éther diéthylique (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ont été ajoutés dans le tube à essai qui a ensuite été agité vigoureusement pendant 10 à 15 sec. La phase organique supérieure a été récupérée dans un vial de 10 mL. L'extraction à l'éther diéthylique a été effectuée trois fois et chaque fois la phase organique a été récoltée dans le même vial de 10 mL. Le solvant a été complètement évaporé sous flux d'azote puis les lipides ont été dissouts dans 500 µL d'éther diéthylique et transférés dans un vial de 2 mL avec un bouchon septum. Le vial de 10 mL a été rincé avec 500 µL d'éther diéthylique transféré dans le vial de 2 mL. La phase aqueuse restante dans le tube à essai a ensuite été acidifiée par ajout de 500 µL d'acide chlorhydrique 37 % (v/v) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) et trois extractions à l'éther diéthylique ont été réalisées comme précédemment avec récupération de la phase organique en vial de 10 mL puis transfert dans un vial de 2 mL avec bouchon septum.

Une étape de silylation a ensuite été réalisée sur tous les échantillons par ajout de 100 µL de pyridine et 100 µL de *N,O*-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA, agent silylant) suivi d'une incubation 1h à 80 °C. Le volume dans chaque vial a ensuite été ajusté à 1 mL par ajout de 800 µL de 2,2,4-triméthylpentane (isooctane).

L'analyse a été réalisée sur une GC de marque Varian de type 3400 CX équipé d'un injecteur "on-column" de type SPI couplé à un spectromètre de masse (Saturn 2000, Varian) équipé d'une source d'ionisation de type impact électronique (EI, énergie d'ionisation 70 eV) et fonctionnant sur une échelle de masse de  $m/z$  40-600. L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés par le logiciel Varian Saturn Work Station 5.11. La base de données permettant l'identification des composés a été la NIST Mass Spectral Data Base.

La séparation des différents composés a été effectuée sur une colonne capillaire Factor Four VF-5ms (Varian) de 60 m de long et de 0,25 mm de diamètre interne. La température initiale de la colonne était de 50°C (maintenue 2 min). La colonne a ensuite été programmé pour atteindre 105 °C avec un gradient de 7 °C/min (maintenue 2 min) puis 170 °C avec un gradient de 10 °C/min (maintenue 2 min) et pour finir 320°C avec un gradient de 7°C/min (maintenue 15 min). La température de l'injecteur était de 50°C et a été programmé pour atteindre la température de 300°C avec un gradient de 100 °C/min maintenue jusqu'à la fin de l'analyse.

Le volume d'injection a été de 1 µL. Il était contrôlé grâce à un injecteur automatique 8500 Varian. Le gaz vecteur était de l'hélium (pureté 99,9995 % air liquide, France) avec un débit de



1 mL/min. Les acides gras ont été quantifiés par rapport au C17 et les stérols par rapport au cholestérol.

### 11. Microscopie confocale

Les cellules de *L. thermotolerans* et *S. cerevisiae* ont été observées en microscopie confocale avec un microscope Leica TCS SP8 (DimaCell platform, INRA Dijon) en utilisant le logiciel Leica LAS X. Les cellules ont été observées non marquées (autofluorescence) ou marquées au fluorochrome cFDA, IP, Nile Red et DHE pendant la fermentation alcoolique (une fois par jour). Ces quatre fluorochromes ont été excités par une LED à 488 nm et la fluorescence émise a été collectée par des détecteurs hybrides HyD.

### 12. Analyse métabolomique par FT-ICR-MS

Les spectres de masse à injection directe FT-ICR ont été acquis avec un spectromètre de masse FT-ICR Bruker Solarix équipé d'un aimant de 12 Tesla (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne). Les échantillons ont été dilués à 2:100 (v / v) dans du méthanol (qualité LC-MS, Fluka, Allemagne). Des échantillons de contrôle qualité (QC) ont été préparés en mélangeant des quantités égales (20  $\mu$ L) de tous les échantillons. Les échantillons de QC ont été analysés au début d'analyse ainsi que tous les 10 échantillons pour contrôler la reproductibilité des mesures dans le temps. Les échantillons dilués et les QC ont été injectés dans la source d'ions par électrospray avec un débit de 2  $\mu$ L min<sup>-1</sup>. Les réglages de la source d'ions ont été les suivants: température du gaz de séchage 180 ° C, débit du gaz de séchage 4,0 L min<sup>-1</sup>, tension capillaire 3600 V. Les spectres ont été acquis avec un domaine temporel de 4 mégawords et 300 balayages ont été accumulés dans une gamme de masse allant de  $m/z$  92 à 1000. Un pouvoir de résolution de 400000 à  $m/z$  300 a été atteint.

La FT-ICR-MS a d'abord été étalonnée au moyen de cluster d'arginine (10 ppm dans du méthanol). Ensuite, les spectres bruts ont été calibrés en interne en utilisant une liste de référence comprenant des marqueurs de vin et des acides gras ubiquitaires connus pour obtenir la meilleure précision de masse possible parmi les échantillons. Les spectres bruts ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel Compass DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne). Les pics avec un rapport signal sur bruit (S/N) d'au moins 6 ont été exportés vers des listes de masse. Toutes les masses exportées ont été alignées dans une matrice contenant les valeurs moyennes  $m/z$  (largeur maximale de la fenêtre d'alignement des pics :  $\pm$  1 ppm) et les intensités des pics correspondants de tous les échantillons analysés. Seules les caractéristiques

$m/z$  des candidats monoisotopiques et les caractéristiques présentant un défaut de masse réaliste ont été retenues dans la matrice.

### 13. Analyses statistiques

Pour la comparaison des moyennes entre les conditions de fermentations, le test T de student a été utilisé avec le logiciel XLStat 2016 et Microsoft Excel 2016.

L'analyse de variance (ANOVA) avec le test de Tukey pour le groupement des composés volatils ont été effectués avec le logiciel XLStat 2016 et Microsoft Excel 2016. L'analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse de cluster hiérarchique (HCA) des composés volatils ont été effectuées avec le logiciel SIMCA v15 (Umetrics, Sartorius, Suède).

Tous les traitements de données de FT-ICR-MS ont été effectués dans Microsoft Excel 2010 et R Statistical Language (version 3.4.1). Seules les caractéristiques moléculaires détectées dans au moins deux des trois réplicats ( $S / N \geq 6$ ) d'un groupe d'échantillon ont été prises en compte pour une analyse et une interprétation plus poussée des données. L'ACP, l'HCA et l'ANOVA ont été effectuées à l'aide de Perseus 1.5.1.6 (Max Planck Institute of Biochemistry, Allemagne). Pour les clusters, la distance euclidienne et la liaison moyenne ont été choisies et pour les ANOVA, une valeur seuil de 0,05 a été retenue.

## Résultats

La partie « Résultats » rassemble les résultats des travaux réalisés pendant cette thèse. Elle est présentée sous forme d'articles scientifiques (soumis ou en préparation) précédés d'un résumé en français. Un plan est proposé correspondant à la suite chronologique des travaux de recherche :

1. <u>Suivi physiologique des levures par cytométrie en flux au cours de la fermentation alcoolique</u> .....	68
1.1. Publication scientifique .....	68
1.2. Optimisation du protocole de marquage à l'Iodure de Propidium (IP) .....	95
2. <u>Influence du contact cellule-cellule sur les interactions levure-levure et l'exo-metabolome</u> .....	96

## 1. Suivi physiologique des levures par cytométrie en flux au cours de la fermentation alcoolique

### 1.1. Publication scientifique

**Résumé :** les études portant sur des co-fermentations entre *S. cerevisiae* et certaines non-*Saccharomyces* sont de plus en plus nombreuses dans le but de trouver le couple de levures permettant d'orienter la complexité aromatique du vin produit en fonction de l'effet de l'association des deux espèces. Ces études s'intéressent donc pour la plupart aux interactions ayant lieu entre *S. cerevisiae* et les non-*Saccharomyces*, avec le plus souvent des suivis de viabilité comme seul paramètre physiologique étudié. Dans le but d'élargir l'analyse physiologique des levures au cours de la fermentation alcoolique, la cytométrie en flux a été envisagée comme outil. Le principal inconvénient de cette technique est la différenciation des populations de levures d'espèces différentes puisque la plupart des levures possèdent une taille et une granulosité fortement similaire. Cependant, une bonne différenciation entre une souche commerciale de *S. cerevisiae* et une souche de *S. bacillaris* isolée précédemment au laboratoire par cytométrie en flux juste par la taille et la granulosité des levures a été mise en évidence dans cette étude. De ce fait, des fermentations pures de ces deux espèces de levures et une fermentation séquentielle (inoculation de *S. cerevisiae* 48 h après *S. bacillaris*) ont été effectuées dans du jus de raisin standardisé à 200 g.L<sup>-1</sup> de sucres. La cinétique fermentaire de chaque fermentation a été suivie et trois marqueurs fluorescents ont ensuite été testés sur ces deux espèces pendant la fermentation alcoolique pour suivre la physiologie des levures par cytométrie en flux. Ainsi, la carboxy-Fluoresceine Di-Acétate (cFDA) a permis de suivre la viabilité des levures, le Nile Red a permis de déterminer la teneur en particules lipidiques dans les levures et le DiHydroEthidium (DHE) a permis de quantifier de manière indirecte la quantité d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS) dans les levures. Les résultats obtenus sur ce couple de levure ont permis de valider l'utilisation de ces trois marqueurs fluorescents pour suivre la physiologie des deux espèces étudiées.

Dans le but d'élargir l'application du protocole de cytométrie en flux, une autre levure non-*Saccharomyces* a été étudiée : *L. thermotolerans*. Cependant, il est impossible de discriminer *S. cerevisiae* de *L. thermotolerans* par cytométrie en flux juste par leur taille et leur granulosité. Une souche modifiée de *S. cerevisiae* exprimant une GFP a donc été utilisée pour étudier ce couple. Dans un premier temps, la cinétique fermentaire et la viabilité de cette souche de *S. cerevisiae* modifiée ont été comparées à celles de la souche parentale. Aucune différence

significative n'a été décelée, validant l'utilisation de la souche GFP pour le reste de l'expérience. Ainsi, des fermentations pures de chaque espèce et une fermentation séquentielle de 48 h ont été effectuées dans des conditions œnologiques plus réelles en utilisant du moût de Chardonnay contenant  $224 \text{ g.L}^{-1}$  de sucres. La cinétique fermentaire de chaque fermentation a été suivie, et les trois marqueurs fluorescents (cFDA, Nile Red et DHE) ont été utilisés pour analyser la physiologie des levures au cours de la fermentation alcoolique. Les résultats ont ici aussi permis de valider l'utilisation de ces marqueurs fluorescents sur ce couple de levures. De plus, avec les deux couples étudiés, des interactions entre les deux espèces ont été mises en évidence. En effet, une diminution de la viabilité en fin de fermentation a été observée pour les deux non-*Saccharomyces*, mais aussi une diminution de la population maximale de *S. cerevisiae* en fermentation séquentielle avec les deux non-*Saccharomyces*, plus forte avec *L. thermotolerans* qu'avec *S. bacillaris*.

L'utilisation de marqueurs fluorescents nécessite une étape de validation par microscopie à fluorescence. Ainsi, les trois marqueurs fluorescents utilisés dans cette étude ont été vérifiés par microscopie confocale lors de l'expérience avec le couple *S. cerevisiae* GFP/*L. thermotolerans* pendant les fermentations pures et la fermentation séquentielle. La microscopie a permis de valider les marquages, notamment pour le Nile Red avec un marquage spécifique des particules lipidiques dans le cytoplasme des levures et le DHE avec un marquage spécifique de l'ADN mitochondrial.

Pour conclure, cette étude a permis de mettre au point un protocole de cytométrie en flux pour la discrimination des levures *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces* d'une part, et d'autre part l'utilisation de trois marqueurs fluorescents permettant de suivre la physiologie des levures au cours de la fermentation alcoolique a été validé.

## Yeast physiology monitoring by flow cytometry during alcoholic co-fermentations

Clément Petitgonnet\*, Hélène Cousin, Géraldine L. Klein, Hervé Alexandre.

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe VALMiS (Vin, Aliment, Microbiologie, Stress), AgroSup Dijon – Université de Bourgogne Franche-Comté, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, rue Claude LADREY, BP 27877, 21000 DIJON, France.

\*: corresponding author [clement.petitgonnet@gmail.com](mailto:clement.petitgonnet@gmail.com)

### Abstract

Non-*Saccharomyces* yeasts are naturally found during winemaking and they cohabit during alcoholic fermentation with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The interest for non-*Saccharomyces* yeasts is more and more important, especially for their ability to modulate wine aroma complexity. But this cohabitation triggers some interactions between species, most of the time negatives for non-*Saccharomyces* yeasts. Several studies focused on the understanding of these interactions, however they rarely include a physiological monitoring of yeasts. In this way, a new protocole of flow cytometry was established allowing the discrimination of yeast species population and the monitoring of different yeast physiological parameters such as viability, lipid droplets and reactive oxygen species accumulations thanks to specific dyes. It was then successfully used to monitor these parameters during sequential fermentations (*S. cerevisiae* inoculated 48 h after the non-*Saccharomyces*) performed with two couples of non-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae* yeasts and staining were confirmed by confocal microscopy. Results have shown a decrease of both non-*Saccharomyces* viabilities at the end of sequential fermentations but also that the maximum population of *S. cerevisiae* is lower in sequential fermentations compared to its pure fermentation. In addition, an increase of ROS accumulation was detected in *Starmerella bacillaris* at the end of the sequential fermentation. No differences were observed between *S. cerevisiae* pure fermentation and sequential fermentation kinetics with the couple *S. bacillaris*/*S. cerevisiae*. However, the fermentation kinetic obtained with the couple *Lachancea thermotolerans*/*S. cerevisiae* was slower than *S. cerevisiae* pure fermentation. This study brings a new method to study yeast-yeast interactions during sequential fermentations of grape must but also highlight that interactions between these yeast species are mostly negative but not only for non-*Saccharomyces* yeasts.

**Keywords:** flow cytometry, *S. bacillaris*, *S. cerevisiae*, *L. thermotolerans*, confocal microscopy, sequential fermentation.

## Introduction

*Saccharomyces cerevisiae* is the yeast mostly used in several activities, and more particularly for fermentation processes. Among them, winemaking use *S. cerevisiae* for thousand years and humans have selected the best strains of *S. cerevisiae* to make quality wines. However, other yeast species found on grape berries and/or in grape must were pointed out: the non-*Saccharomyces* yeasts, including different genera such as *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Starmerella*, *Torulaspota* or *Lachancea* (Albertin et al., 2017; Comitini et al., 2011; P.-T. Liu et al., 2016; Padilla et al., 2016). Non-*Saccharomyces* yeasts were firstly linked to spoilage wine or stuck fermentation (Fleet, 1993; Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003) but are now studied for their interesting ability to modulate wine aroma complexity with a higher production of aroma compounds such as terpenoids or esters (Jolly et al., 2006, 2014; Viana et al., 2008). Thus, a co-inoculation of two selected yeasts composed by a non-*Saccharomyces* strain and a *S. cerevisiae* strain constitutes a strategy used by winemakers to change or improve the aromatic profile of the wine.

Among non-*Saccharomyces* yeasts, *Lachancea thermotolerans* and *Starmerella bacillaris* are interesting for their potential aromatic properties in final wine. In addition, *L. thermotolerans* could be of interest for low acidity must since it is a great producer of L-lactic acid (Gobbi et al., 2013; Mora et al., 1990). Moreover, these two non-*Saccharomyces* species present a difference of behavior in pure fermentations and a co-fermentation with *S. cerevisiae* (Ciani et al., 2006; Nissen et al., 2003; Sadoudi et al., 2012). Indeed, Sadoudi et al. (2012) have shown an aromatic profile of *S. bacillaris* pure fermentation presenting a production of interesting lactones, aromatic compounds with fruity notes, molecules that are absent from the co-fermentation with *S. cerevisiae*. In the case of *L. thermotolerans*, different studies present an early growth arrest or die off in co-fermentation with *S. cerevisiae*, such phenomena absent in pure fermentation (García et al., 2017; Holm Hansen et al., 2001; Kapsopoulou et al., 2006; Kemsawasd et al., 2015a). Mechanisms involved in the death of *L. thermotolerans* are not fully understood, even if some hypothesis are suggested by authors such as cell-cell contact or secretion of an antimicrobial peptide by *S. cerevisiae*.

However, these studies never include a physiological analysis of yeasts during alcoholic fermentation. The monitoring of physiological parameters like enzymatic activity or oxidative stress could be the first keys to understand what happen inside cells in a co-fermentation. In order to assess each yeast species physiology, it is necessary to be able to discriminate each yeast population. Currently, populations in co-fermentations of non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* are discriminated mostly by using culture-dependent methods like plate counting,

with different media for *S. cerevisiae* (YPD) and for non-*Saccharomyces* yeasts (Lysine), or like microscopy when yeast can be differentiated (Bely et al., 2008; Gobbi et al., 2013; Gobert et al., 2017; Sadoudi et al., 2012; Simonin et al., 2018; Wang et al., 2015). But these methods are fastidious, that is why some culture-independent methods are also used like quantitative PCR (q-PCR) or Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), with specific probes for each yeast species. Unfortunately, these methods are quite long, expensive and can quantify dead cells, leading to false positive results (Andorra et al., 2011; Hierro et al., 2006; Pérez-Nevado et al., 2006; Xufre et al., 2006). Moreover, all these studies only inform about yeast viability and cultivability but not about other yeast physiology parameters. Thus, to monitor and characterize the physiology of yeasts during alcoholic fermentation, a powerful tool was chosen in this study: the flow cytometry. This technique run on cell staining with different dyes, each being specific of a physiological reaction in cells. In this study, pure fermentations of *S. cerevisiae*, *S. bacillaris* and *L. thermotolerans* as well as co-fermentations of *S. cerevisiae*/*S. bacillaris* or *S. cerevisiae*/*L. thermotolerans* were analyzed by flow cytometry (verified by confocal microscopy) with the aim of bringing new methods and tools to monitor yeast physiology during alcoholic fermentations using flow cytometry and specific dyes.

## Materials and methods

### Yeast strains

Two different *S. cerevisiae* strains were used in this study: *S. cerevisiae* Fermol-PB2023 (SPINDAL-AEBgroup, France) as a commercial control for alcoholic fermentation experiments and a *S. cerevisiae* modified strain supplied by INRA/SupAgro Montpellier: *S. cerevisiae* 59A-GFP MATa ho *AMN1::TEF2Pr-GFP-ADH1-NATMX4*, a haploid derivative of the commercial wine strain EC1118 modified to strongly express an eGFP(S65T)(Marsit et al., 2015).

*L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20 and *S. bacillaris* MCR-9 (previously isolated and identified by Sadoudi et al. (2012)) were the non-*Saccharomyces* yeast strains used.

### Growth conditions

All yeast strains were grown at 28°C in modified YPD medium (20 g.L<sup>-1</sup> glucose, 10 g.L<sup>-1</sup> peptone and 5 g.L<sup>-1</sup> yeast extract with 18 g.L<sup>-1</sup> of agar for Petri dish cultivation), supplemented with 0.1 g.L<sup>-1</sup> of chloramphenicol. For fermentation inoculation, yeasts were pre-cultured in 250 mL sterile Erlenmeyer flasks, closed with dense cotton plugs, containing 150 mL of modified YPD medium and incubated with agitation (100 rpm) at 28°C for 24h or 48h.



### Fermentation condition

*S. cerevisiae* Fermol-PB2023 and *S. bacillaris* MCR-9 were used for alcoholic fermentations in commercial white grape juice initially containing 80 g.L<sup>-1</sup> of glucose and 80 g.L<sup>-1</sup> of fructose, supplemented to 100 g.L<sup>-1</sup> of each sugar. This standardized grape juice was sterilized by filtration on a 0.22 µm sterile membrane (Stericup-GP, MERCK-Millipore). *S. cerevisiae* 59A-GFP and *L. thermotolerans* BB7-FA20 were used for alcoholic fermentations in Chardonnay must with a sugar concentration of 224 g.L<sup>-1</sup> (glucose and fructose), sterilized by filtration on 1.2 µm pore size filters.

Fermentation kinetics were followed by sugar depletion and ethanol production thanks to Fourier Transform Mass Spectrometry (FTIR, OenoFOSS™, FOSS, Hilleroed, Denmark). They were monitored during 15 days for couple *S. cerevisiae*/*L. thermotolerans* and 20 days for couple *S. cerevisiae*/*S. bacillaris*, because of the poor fermentation rate of *S. bacillaris*. To carry out quantifications, 200 µL of centrifuged culture (12,000 g for 5 min at 4°C) were added to the detection cell and were analyzed with FOSS User Interface software. Each experiment was performed in biological triplicate.

### Pure fermentations

Pure fermentations were carried out in 250 mL sterile Erlenmeyer flasks, closed with dense cotton plugs, containing 200 mL of standardized white grape juice or Chardonnay must. Each flask was inoculated with 10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> from YPD medium pre-culture of *S. cerevisiae* or non-*Saccharomyces* yeasts and incubate at 20°C without agitation to mimic the winery conditions.

### Sequential fermentations

Sequential fermentations were prepared in the same way as for pure fermentations, except that *S. cerevisiae* was inoculated 48h after the non-*Saccharomyces* yeasts. Both yeast species were inoculated at 10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> and flasks were incubated at 20°C without agitation.

### Flow cytometric analysis

#### Yeast physiology

All the fluorescent dyes used in this study were purchased from Invitrogen, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific (Illkirch, France).

Yeast viability during fermentations was monitored using carboxy-Fluorescein DiAcetate (cFDA) as fluorescent dye (maximum excitation/emission wavelengths 490/525 nm). 1 mL of fermenting yeasts was centrifuged at 12,000 g for 5 min at 10°C. Pellet was resuspended in 1

mL of McIlvaine buffer (100 mM citric acid, 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4) and serial dilutions were prepared. 100 µL were aliquoted and 3 µL of cFDA at 1,500 µM in acetone were added. Samples were incubated 15 min for *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* or 20 min for *S. bacillaris* in the dark. Then, samples were analyzed by flow cytometry. For the sequential fermentation, *S. cerevisiae* 59A-GFP cells positive to GFP (non-stained with cFDA) were count as viable cells and a subtraction between the total cells positive to cFDA and GFP positive cells give the *L. thermotolerans* viable cells.

Yeast physiology was also monitored during fermentations with other fluorescent dyes. Nile Red dye (maximum excitation/emission wavelengths 552/636 nm) was used to assess the lipid accumulation in yeast cytoplasm. DiHydroEthidium (DHE) dye (maximum excitation/emission wavelengths 500/580 nm) was used to detect the Reactive Oxygen Species (ROS) accumulation in yeasts. Regarding to protocols used for Nile Red and DHE staining, 1 mL of fermenting yeasts were centrifuged at 12,000 g for 5 min at 10°C. Pellet was resuspended in 1 mL of Phosphate Buffer Saline (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, and 11.9 mM Phosphate, pH 7.2) (Fisher Scientific, Illkirch, France) and serial dilutions were prepared. Samples were then aliquoted in 200 µL and 800 µL of cell suspension in PBS. In the 200 µL aliquot, 1.28 µL of DHE at 5 mM in DiMethyl SulfOxide (DMSO) were added and in the 800 µL aliquot, 8 µL of Nile Red at 32.4 µM in acetone were added. Samples were incubated 10 min in the dark and analyzed by flow cytometry.

#### Flow cytometer settings

Flow cytometric analysis were performed with a BD Accuri C6 flow cytometer and data analyzed with the BD Accuri C6 software. For each run, a FSC threshold of 80,000 was used, 20 µL of samples were analyzed at 34 µL.min<sup>-1</sup> and SSC-H/FSC-H were analyzed using logarithmic axes. A 488-nm wavelength argon laser was used to excite cells (autofluorescence) and dyes used. Two filters were used to detect fluorescence emission: FL1-H filter (530±30 nm) for cFDA fluorescence and FL2-H filter (585±40 nm) for DHE/Nile Red fluorescence.

#### Confocal Microscopy

Confocal microscopy observations were done with a Leica TCS SP8 (DimaCell platform, INRA Dijon) and the Leica LAS X or Leica LAS AF lite software. For all fluorochrome visualization, a 488-nm diode was used to excite cells and HyD hybrid detector were used as emission filter, and specific profiles (HyD bandpass) were created for GFP/cFDA, Nile Red and DHE after the drawing of excitation/emission spectrum.

## Results

### Couple *S. cerevisiae* PB-2023/*S. bacillaris* MCR-9

#### Flow cytometry analysis

Thanks to flow cytometry, it is possible to count yeast cells during alcoholic fermentation and to analyze their physiology with specific fluorochromes. However, a problem occurs in co-fermentations compared to pure fermentations to distinguish each yeast population. Yeast cells have generally a similar size and granularity even if there are different species. Nevertheless, *S. bacillaris* MCR-9 cells are a specific case. Indeed, *S. bacillaris* and *S. cerevisiae* cells have a different size, allowing their discrimination only with this parameter (fig. 1).

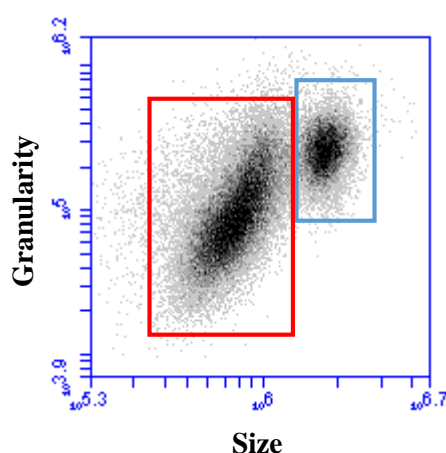


Figure 1: Plot of flow cytometry analysis (granularity as Y-axis and size as X-axis) of a co-fermentation of *S. bacillaris* (red border) and *S. cerevisiae* (blue border). Each yeast population is clearly separated with size.

In addition, the staining of these yeast species with a dye showed a difference of fluorescence between both species allowing also a good discrimination (fig. 2). That is why the couple *S. bacillaris*/*S. cerevisiae* was chosen to develop a yeast physiology monitoring by flow cytometry for co-fermentation.

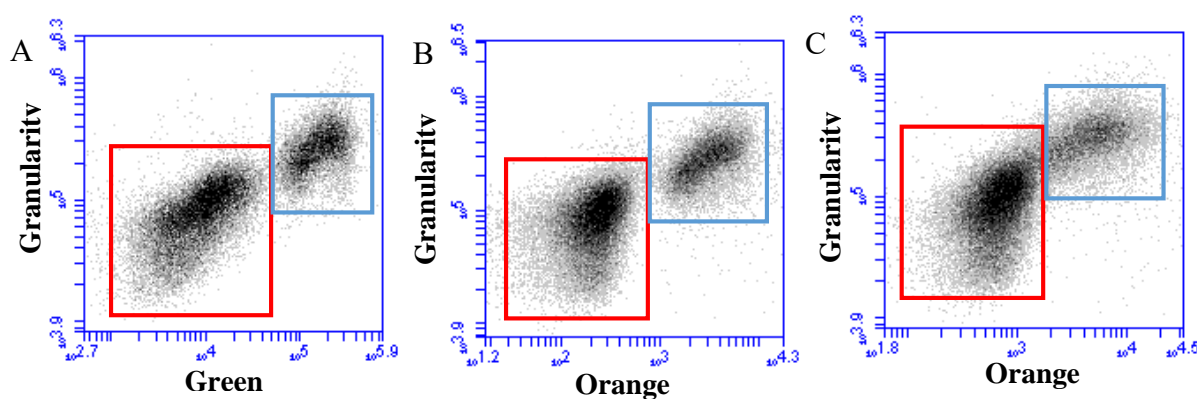


Figure 2: Plot of flow cytometry analysis (granularity as Y-axis and green or orange fluorescence as X-axis) of a co-fermentation of *S. bacillaris* (red border) and *S. cerevisiae* (blue border). Yeasts were stained with (A) cFDA to analyze their vitality, (B) with DHE to quantify the ROS accumulation inside cells or (C) with Nile Red to quantify the lipid droplets accumulation inside cells.

### Fermentation kinetic and cell physiology

Sugar consumption and ethanol production were monitored each day for pure and sequential fermentations during 20 days (Fig. 3). The pure fermentation of *S. cerevisiae* completed the alcoholic fermentation in 11 days without residual sugars with 11.8% (v/v) of ethanol, contrary to *S. bacillaris* that presented a longer fermentation, with 20 g.L<sup>-1</sup> of sugars remaining in grape juice after 20 days and only 10% (v/v) of ethanol. Regarding to the sequential fermentation, the fermentation is completed in 12 days, one day more than *S. cerevisiae* pure fermentation with a similar fermentation kinetic.

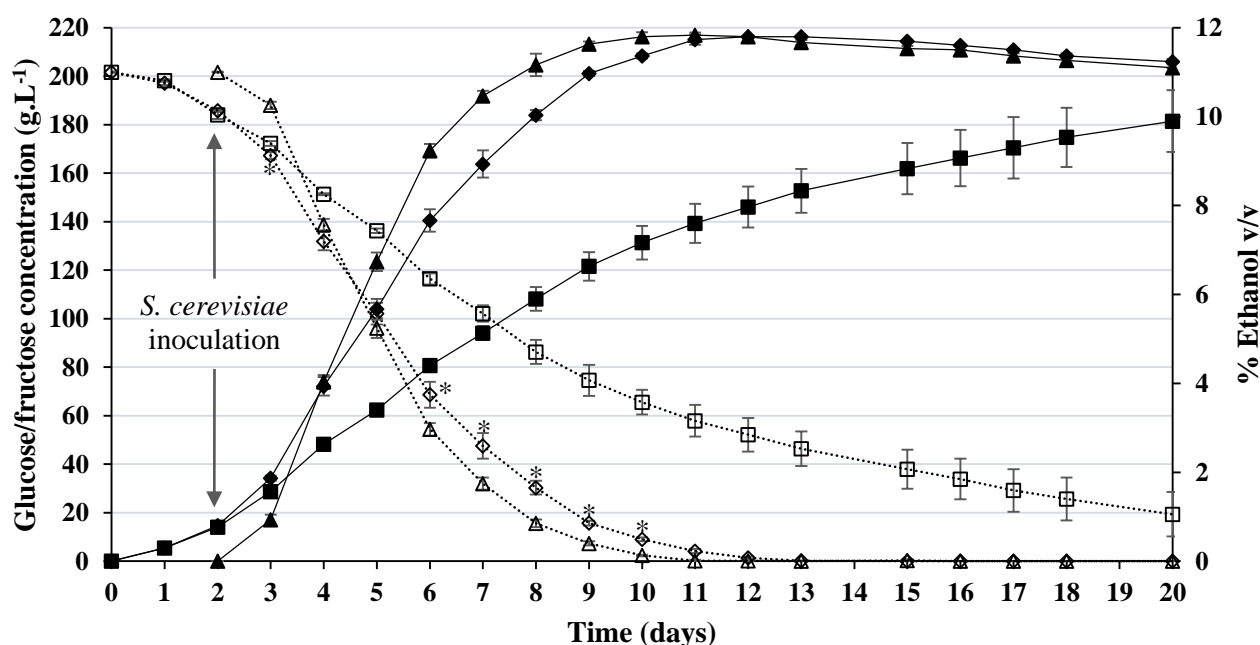


Figure 3: Fermentation kinetics showing sugar consumptions (glucose and fructose) and ethanol production by yeasts in pure and sequential fermentations in standardized grape juice at 20°C: ▲ Glucose/fructose and △ % Ethanol (v/v) *S. cerevisiae*; ■ Glucose/fructose and □ % Ethanol (v/v) *S. bacillaris*; ◆ Glucose/fructose and ◇ % Ethanol (v/v) sequential fermentation. \* significant difference (T-test, p-value < 0.05) between pure fermentation of *S. cerevisiae* and sequential fermentation.

Cell viability was here monitored by cFDA staining, which is cleaved by intracellular esterase in viable cells releasing fluorescein that emit a green fluorescence (Dive et al., 1988). The sequential fermentation presented a maximum of viable *S. bacillaris* cells about  $7.5 \times 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup> during all the fermentation, which is 2-fold lower than the pure fermentation which reached  $1.42 \times 10^8$  cells.mL<sup>-1</sup> (Fig. 4A). For *S. cerevisiae*, the maximum of viable cells is about  $4.0 \times 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup> in the sequential fermentation, which is 2.8-fold lower than the pure fermentation (Fig. 4A). These differences between pure and sequential fermentations are statistically different (t-test, *p*-value < 0,05). Nevertheless, after 15 days of fermentation, no positive *S. bacillaris* cells to cFDA can be observed reflecting yeast cell death at the end of fermentation.

Some other yeast physiology parameters were monitored by staining cells with Nile Red and DHE. The accumulation of lipidic droplets inside cell cytoplasm can reflect a lipidic stress in yeasts (Mannazzu et al., 2008; Müllner and Daum, 2004) and can be measured by Nile Red staining (Greenspan et al., 1985). Nile Red fluorescence results (fig. 4B) showed that in pure fermentations, there is no accumulation of lipidic droplets in *S. bacillaris* cells whereas an important accumulation in *S. cerevisiae* cells is observed after inoculation and then a decrease all along the fermentation. In the sequential fermentations, *S. cerevisiae* cells exhibit a similar behavior as in pure fermentation, but the accumulation of lipidic droplets is significantly lower (t-test, *p*-value < 0.05). About *S. bacillaris*, no accumulation is observed with no difference compared to pure fermentation, except after day 15 when a strong accumulation of lipidic droplets occurred which correspond to the loss of cell viability.

DHE have been reported as a good indirect marker of ROS accumulation inside cells thanks to its oxidation by ROS (mainly by superoxide anion) leading to its fluorescence form which can bind DNA (Capusoni et al., 2016; Landolfo et al., 2008; Mendes-Ferreira et al., 2010). DHE results (fig. 4C) showed that in pure fermentations, no accumulation of ROS can be observed in *S. bacillaris* cells (less than 10 % of positive cells to DHE at the end of fermentation) whereas *S. cerevisiae* cells present a high presence of ROS with about 95 % of cells positive to DHE. Regarding to the sequential fermentation, *S. cerevisiae* cells present more than 95 % of cells positive to DHE, and *S. bacillaris* cells positive to DHE began to increase after day 7 corresponding to the end of alcoholic fermentation.

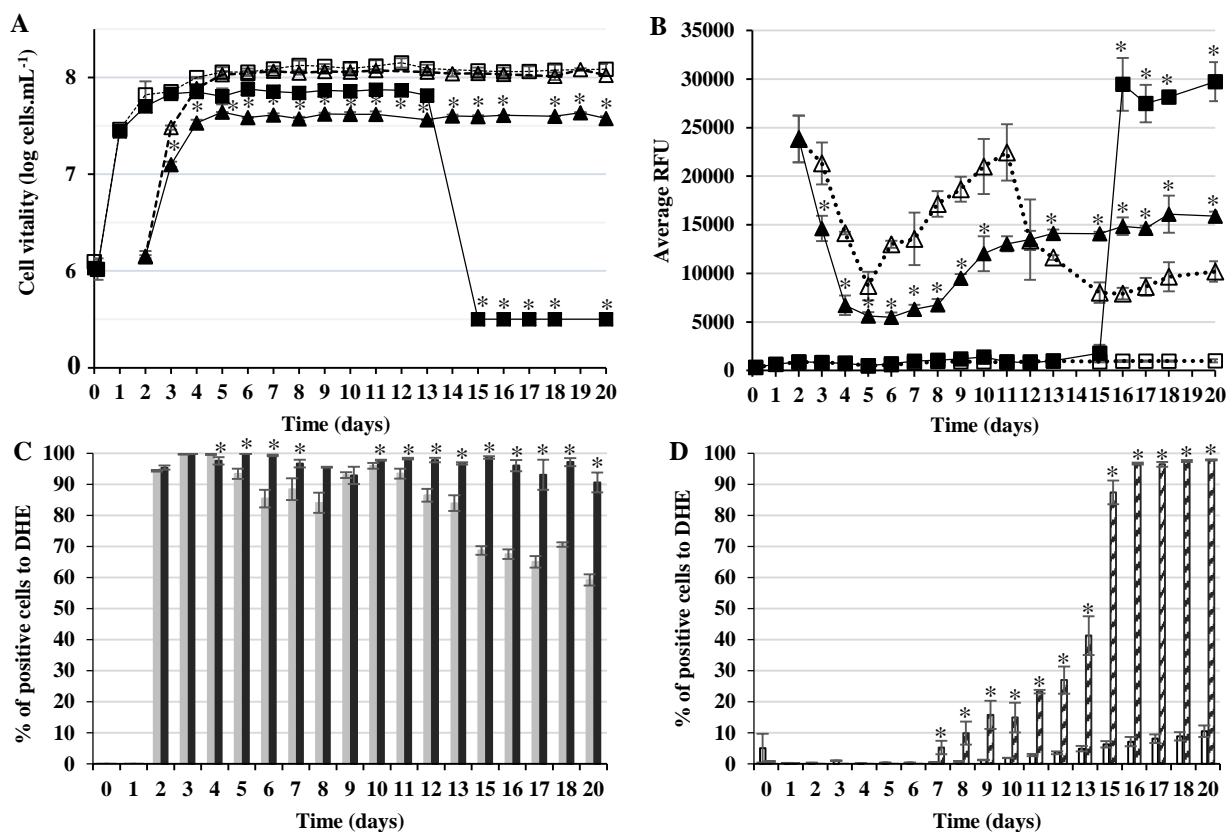


Figure 4: Physiological parameters analysis of yeasts in pure and sequential fermentations in standardized grape juice at 20°C by flow cytometry with (A) growth kinetic of vital cells (cFDA staining): Δ *S. cerevisiae* pure fermentation; ▲ *S. cerevisiae* sequential fermentation; □ *S. bacillaris* pure fermentation; ■ *S. bacillaris* sequential fermentation.

(B) Nile Red staining: Δ *S. cerevisiae* pure fermentation; ▲ *S. cerevisiae* sequential fermentation; □ *S. bacillaris* pure fermentation; ■ *S. bacillaris* sequential fermentation.

(C) and (D) DHE staining: ■ *S. cerevisiae* pure fermentation; ■ *S. cerevisiae* sequential culture; □ *S. bacillaris* pure fermentation and ⊘ *S. bacillaris* sequential fermentation.

\* significant difference (T-test, *p*-value < 0.05) between pure and sequential fermentation for each species.

### Couple *L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20/*S. cerevisiae* 59A-GFP

Thanks to the monitoring of fermentation for the couple *S. bacillaris*/*S. cerevisiae*, we have shown that flow cytometry is suitable for yeast physiology analyses. The good discrimination between *S. bacillaris* and *S. cerevisiae* cells (commercial strain) helps to analyze these species during the alcoholic fermentation in a standardized commercial grape juice. However, this discrimination is unique because most of other non-*Saccharomyces* yeasts cannot be easily discriminate by flow cytometry just with size and granularity. With the aim to analyze different yeast physiology parameters for different couple of yeast, we used a modified *S. cerevisiae* strain expressing a Green Fluorescent Protein (GFP) to have a better discrimination between *S. cerevisiae* and another non-*Saccharomyces* yeast, *L. thermotolerans*, which present interesting enological characteristics as presented in introduction. The couple *L. thermotolerans*/*S. cerevisiae* GFP was tested in a more real enological condition with a Chardonnay grape must

to investigate the future use of the flow cytometry monitoring protocol for micro-vinifications. As shown in figure 5, we could not discriminate *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* based on granularity and size flow cytometry parameters (fig. 5A). However, based on the green fluorescence intensity, the two populations could be easily distinguished (fig. 5B) which allows to monitor ROS and Nile Red staining in both yeast strain during sequential fermentation (fig. 5C and D).

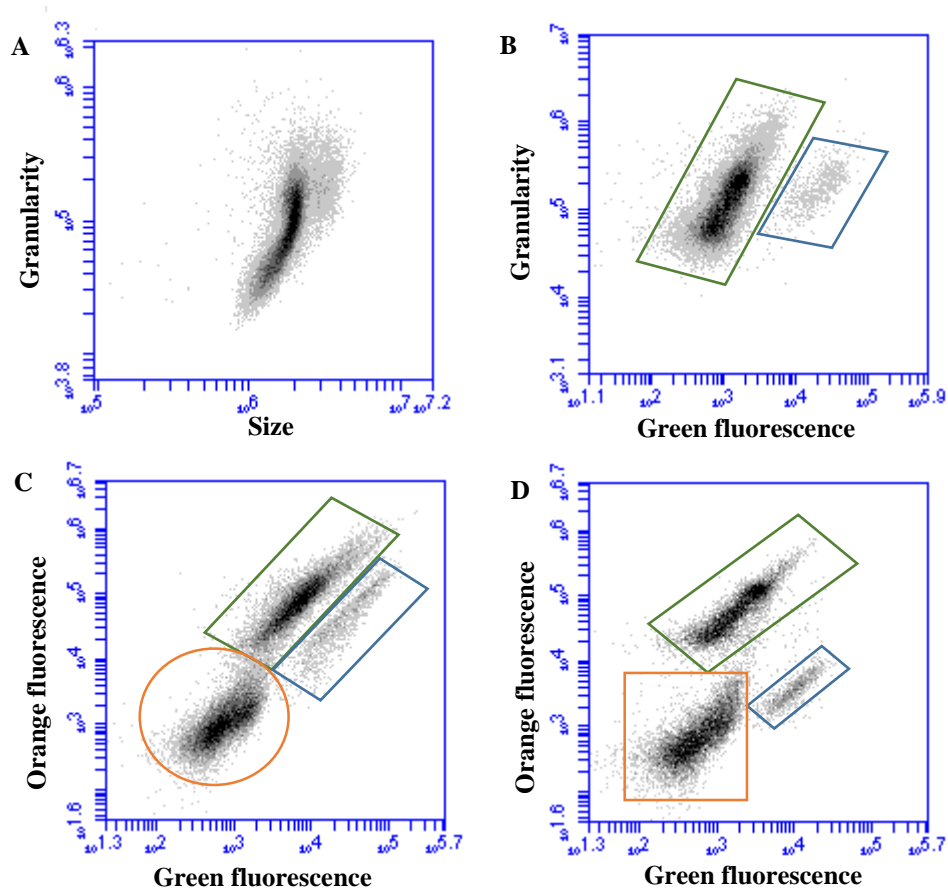


Figure 5: Plot of flow cytometry analysis (granularity as Y-axis and size or green fluorescence as X-axis) of a co-fermentation of *L. thermotolerans* (green border) and *S. cerevisiae* GFP (blue border). (A) general plot obtained with granularity and size parameters (no distinction between the two yeast populations), (B) without staining, the GFP fluorescence enable a clearly separation of the two yeast population. (C) Nile Red and (D) DHE staining where green borders correspond to positive *L. thermotolerans* cells, blue borders to positive *S. cerevisiae* GFP cells and orange borders to negative *L. thermotolerans* cells. Color compensation was applied to adjust the settings of the two color analysis.

#### Fermentation kinetic of the *S. cerevisiae* modified strain expressing GFP

The use of a modified strain expressing a GFP can result in an oxidative stress in cells altering some gene expression and triggering difficulties for cells to grow regarding to the parental strain (Ganini et al., 2017; Kalyanaraman and Zielonka, 2017). Thus, the parental strain *S. cerevisiae* 59A and the modified strain *S. cerevisiae* 59A-GFP were compared about their fermentation kinetic and their physiology during a complete alcoholic fermentation in order to see if the

modified strain can be suitable for our experiments. Results for fermentation kinetics are represented on figure 6A. Both fermentations were conducted in the same condition and no significant differences (t-test,  $p$ -value < 0.05) were observed for each fermentation kinetic, meaning that the modified strain had the same fermentative activity than the parental strain in the same condition with a complete fermentation (no residual sugars) in 9 days. On the figure 6B, both strain viability is represented and despite a slight difference of initial concentration with  $1.5 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> for *S. cerevisiae* 59A and  $3.4 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> for *S. cerevisiae* 59A-GFP, the number of viable cells increase until day 2 to reach the stationary phase with about  $7.4 \times 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup>. No significant difference (t-test,  $p$ -value < 0.05) was observed after day 2 between both strains in the same condition, meaning that the expression of the GFP do not decrease cell viability regarding to the parental strain.

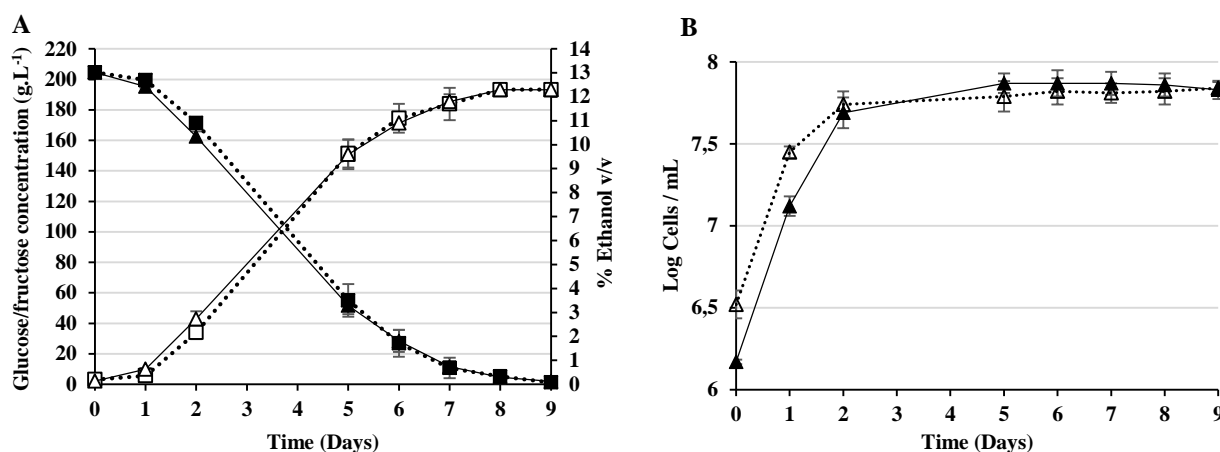


Figure 6: (A) Fermentation kinetics showing sugar consumptions (glucose and fructose) and ethanol production by *S. cerevisiae* 59A and 59A-GFP in pure fermentations in standardized grape juice at 20°C: ▲ Glucose/fructose and △ % Ethanol *S. cerevisiae* 59A; ■ Glucose/fructose and □ % Ethanol *S. cerevisiae* 59A-GFP (B) Viable *S. cerevisiae* 59A and 59A-GFP cells stained with cFDA in pure fermentations in standardized grape juice at 20°C: ▲ *S. cerevisiae* 59A and △ *S. cerevisiae* 59A-GFP.

Thus, *S. cerevisiae* 59A-GFP can be used for alcoholic fermentation and will be very useful to discriminate *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* by flow cytometry.

Fermentation kinetic and cell physiology of the couple *S. cerevisiae* 59A-GFP/*L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20

Sugar consumption and ethanol production were monitored each day for pure and sequential fermentations during 15 days (Fig. 7). The alcoholic fermentation is completed in 12 days without residual sugars with 13.3% (v/v) of ethanol for *S. cerevisiae* pure fermentation. Concerning *L. thermotolerans* and the sequential fermentation, alcoholic fermentations are not



completed in 15 days, with residual sugars about 8.5 g.L<sup>-1</sup> and 2.5 g.L<sup>-1</sup> respectively and an ethanol concentration about 12.3 and 12.6% (v/v) respectively. The sequential fermentation is significantly shorter (t-test, *p*-value < 0.05) than *L. thermotolerans* pure fermentation, despite a very similar kinetic between both fermentations.

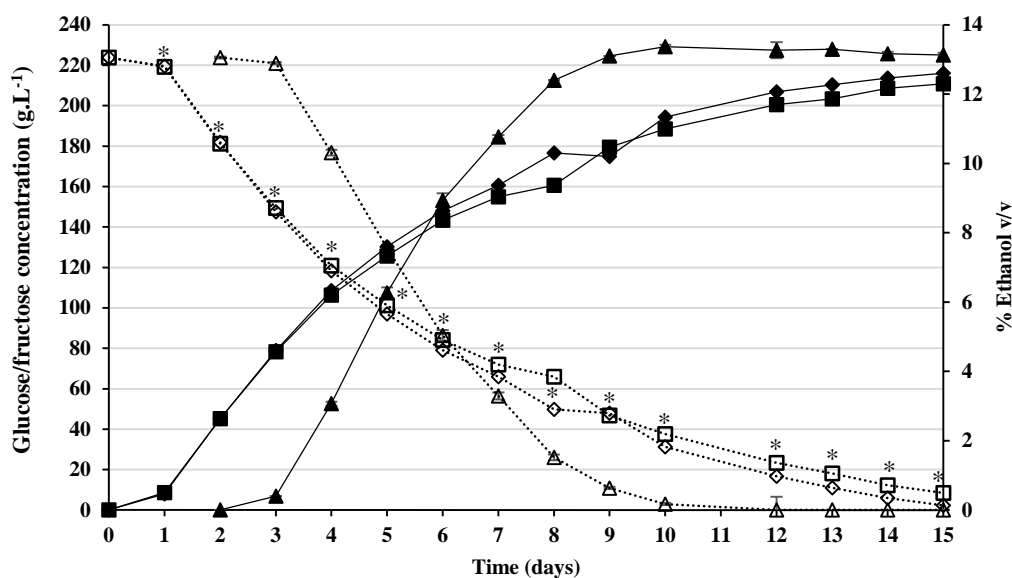


Figure 7: Fermentation kinetics showing sugar consumptions (glucose and fructose) and ethanol production of yeasts in pure and sequential fermentations in Chardonnay must at 20°C: ▲ Glucose/fructose and △ % Ethanol (v/v) *S. cerevisiae*; ■ Glucose/fructose and □ % Ethanol (v/v) *L. thermotolerans*; ◆ Glucose/fructose and ◇ % Ethanol (v/v) sequential fermentation.

\* significant difference (T-test, *p*-value < 0.05) between pure fermentation of *S. cerevisiae* and sequential fermentation.

The yeast viability analysis obtained by cFDA staining (Fig. 8A) showed that *S. cerevisiae* viable population in the 48 h sequential fermentation is about 29-fold lower than in pure fermentation, with  $1.3 \times 10^8$  cells.mL<sup>-1</sup> against  $4.5 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> respectively. Regarding to *L. thermotolerans* viable populations, no significant difference was observed between both fermentations with about  $5.0 \times 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup> until day 10 when the viable population significantly decrease in the sequential fermentation (t-test, *p*-value < 0.05). Yeast physiology was also assessed by staining cells with Nile Red and DHE. Nile Red fluorescence results (fig. 8B) showed that no accumulation of lipidic droplets was observed in *L. thermotolerans* cells in both fermentations, whereas *S. cerevisiae* cells present an accumulation between 2 and 3-fold higher in sequential fermentation than in pure fermentation. DHE results showed that *S. cerevisiae* cells accumulate ROS in a same manner in both fermentations with between 40 and 70 % of positive cells to DHE, except at day 3 with a higher percentage in the pure fermentation and at day 9 to 12 with a higher percentage in sequential fermentation. For *L. thermotolerans*

cells, no significant difference was observed about ROS accumulation in both fermentations until day 13, with a slightly higher percentage of positive cells to DHE in the sequential fermentation.

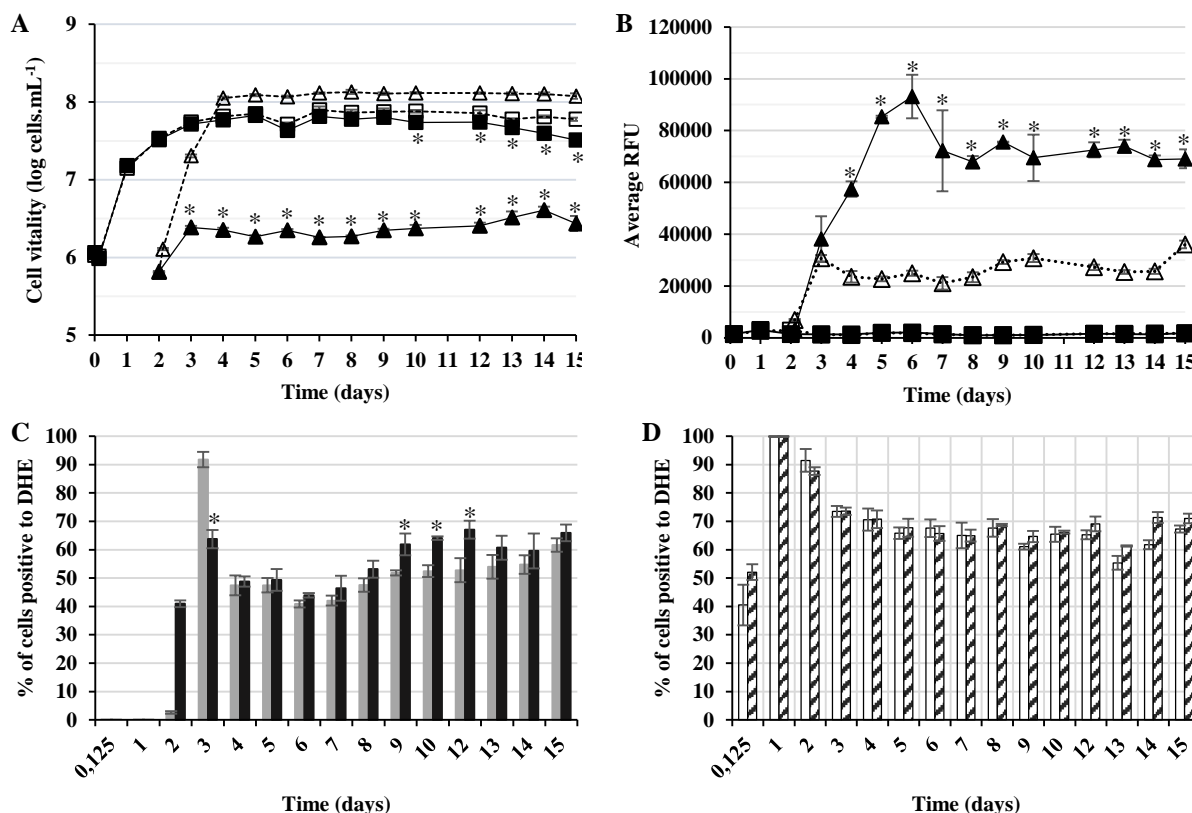


Figure 8: Physiological parameters analysis of *S. cerevisiae* 59A-GFP and *L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20 in pure and sequential fermentations in standardized grape juice at 20°C by flow cytometry with (A) growth kinetic of vital cells (cFDA staining):  $\Delta$  *S. cerevisiae* pure fermentation;  $\blacktriangle$  *S. cerevisiae* sequential fermentation;  $\square$  *L. thermotolerans* pure fermentation;  $\blacksquare$  *L. thermotolerans* sequential fermentation. (B) Nile Red staining:  $\Delta$  *S. cerevisiae* pure fermentation;  $\blacktriangle$  *S. cerevisiae* sequential fermentation;  $\square$  *L. thermotolerans* pure fermentation;  $\blacksquare$  *L. thermotolerans* sequential fermentation. (C) and (D) DHE staining:  $\blacksquare$  *S. cerevisiae* pure culture;  $\blacktriangle$  *S. cerevisiae* sequential culture;  $\square$  *L. thermotolerans* pure fermentation and  $\textcircled{h}$  *L. thermotolerans* sequential fermentation. \* significant difference (T-test,  $p$ -value < 0.05) between pure and sequential culture for each yeast.

To confirm flow cytometry results, a confocal microscopy approach was investigated with this couple to visualize and verify what is stained in cells with our different dyes.

### Confocal microscopy analysis

Thanks to confocal microscopy, the visualization of cells with their different fluorescence emission is possible and the localization of fluorescence can be validated. Indeed, the eGFP(S65T) production by *S. cerevisiae* can be analyzed, firstly by drawing the emission

spectrum as shown in figure 9. This GFP present a maximum emission near 505 nm as described by Heim and Tsien, (1996).

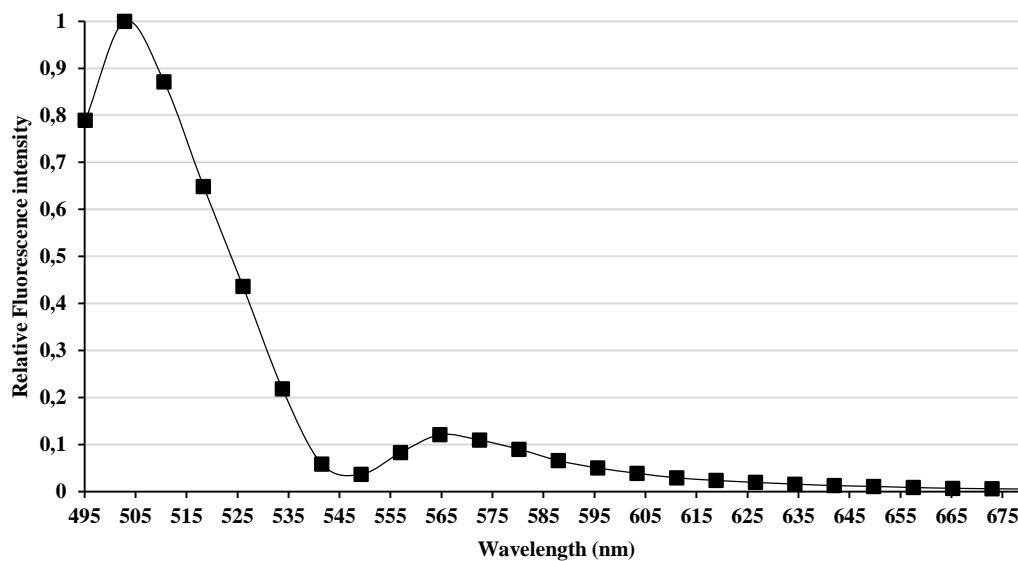


Figure 9: Emission spectrum of GFP from *S. cerevisiae* 59A GFP performed with the Leica SP8 confocal scanning laser microscope and the Las X software (Leica Microsystems). A 488-nm diode was used for excitation, and a HyD detector for fluorescence emission at different wavelengths.

Secondly, it can be noticed that the green protein seems to be localized everywhere in the cell but exclude from vacuole (Fig. 10A, B and C) which present a lack of fluorescence, as expected. In the sequential fermentation, the discrimination of *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* cells is easier as shown in figure 10D, E and F with the bright field and green fluorescence overlay. Despite a strong advantage of this *S. cerevisiae* GFP strain, an important drawback must be considered: the difficulty to use common other green dyes, like the viability dye cFDA. Indeed, the figure 10G and H show very well this drawback with on the one hand pure fermentations of each strain stained with cFDA (viable cells are green) and on the other hand the sequential fermentation stained with cFDA where all cells appear green, so no distinction can be done between *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* cells.

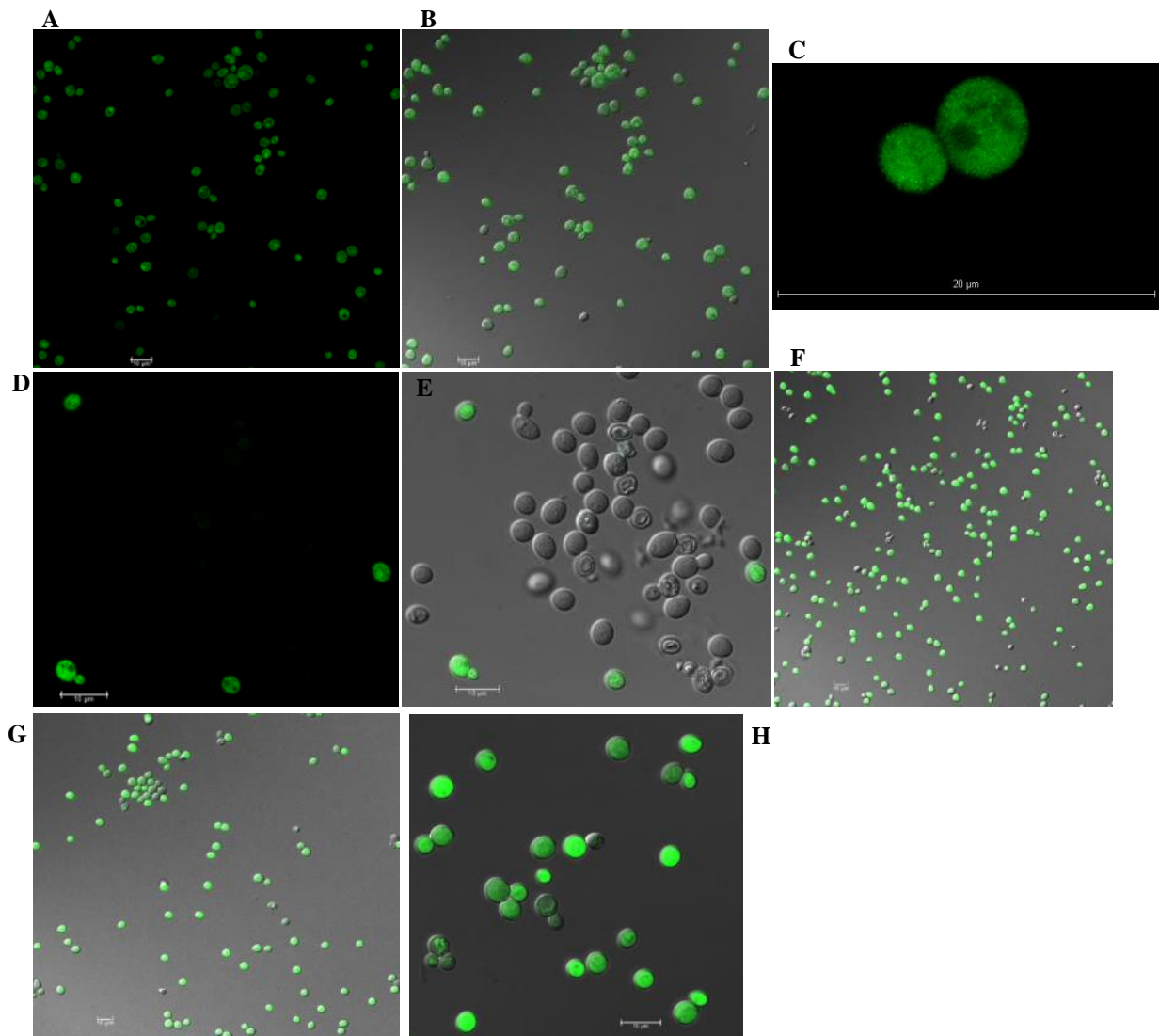


Figure 10: Confocal microscopy images obtained with a Leica SP8 instrument representing (A) GFP fluorescence, (B) overlay of GFP fluorescence and bright field and (C) 3D representation of GFP fluorescence of *S. cerevisiae* 59A-GFP. (D) green fluorescence and (E) overlay of green fluorescence and bright field of *S. cerevisiae* 59-GFP/*L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20 sequential fermentation. Cells were stained with cFDA (green fluorescence) to assess their viability: (F), (G) and (H) overlays of green fluorescence and bright field of *S. cerevisiae* 59A-GFP, *L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20 and the sequential fermentation with both species respectively.

Considering the Nile Red staining, in *S. cerevisiae* cells, this dye appears to stain cytoplasmic lipid droplets as expected (Fig. 11A). Furthermore, the red and green fluorescence overlay (Fig. 11B) from Nile Red and GFP respectively can be detected at the same time. Lipidic droplets are also detected in *L. thermotolerans* cells (fig. 11C and D). For both yeast species, the lipidic droplets are well visible in 3D representation with red and green fluorescence overlay for *S. cerevisiae* (fig. 11E) and red fluorescence for *L. thermotolerans* (fig. 11F). It can be noticed that for the same conditions, the fluorescence emission of Nile Red in *L. thermotolerans* cells is higher than for *S. cerevisiae* cells (data not shown). For sequential fermentation (Fig. 11G), three groups of cells can be distinguished: *L. thermotolerans* cells positive to Nile Red in red,

*S. cerevisiae* cells positive to Nile Red with orange fluorescence (green plus red) inside cells and *L. thermotolerans* cells that are unstained (no fluorescence).

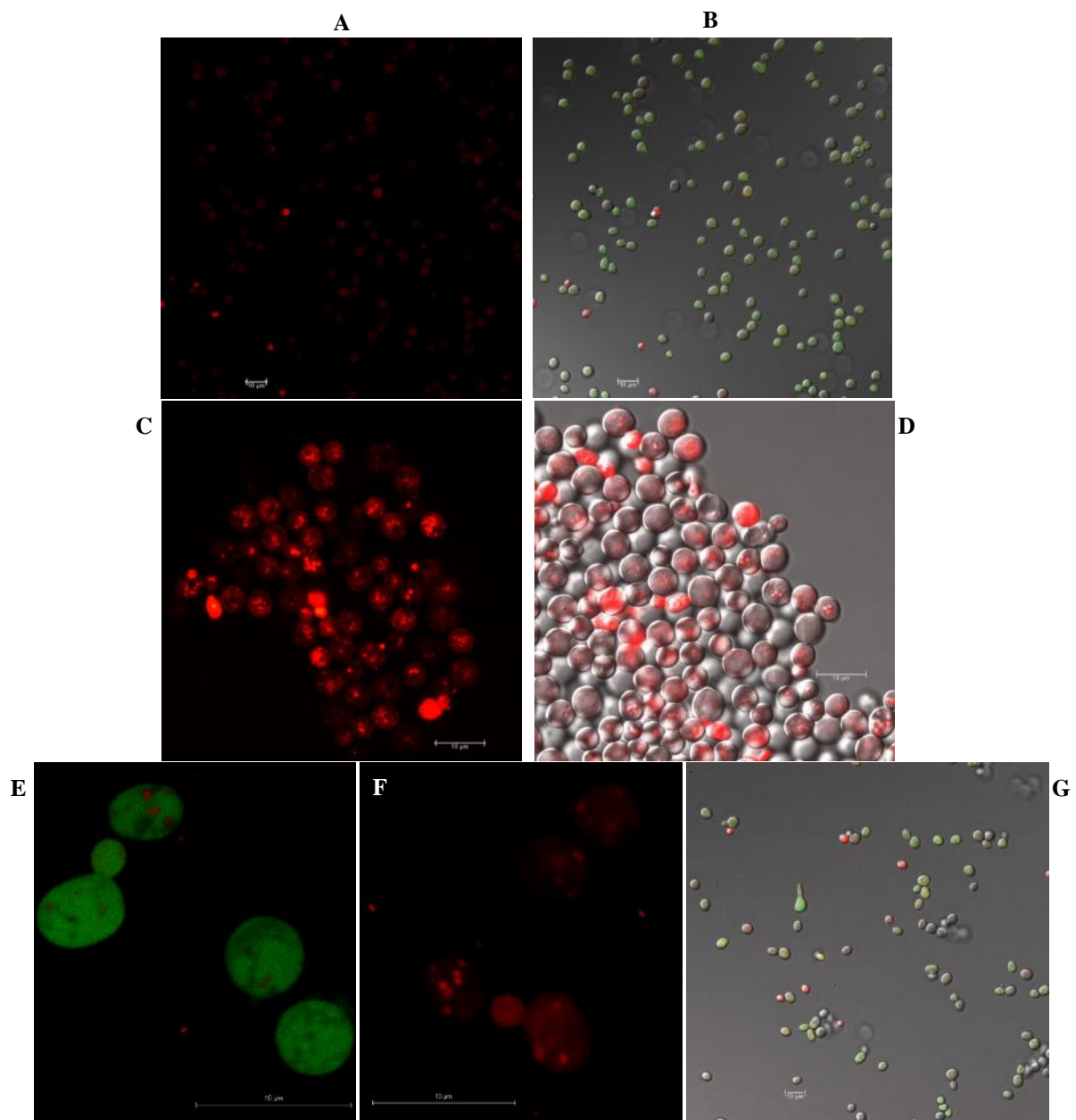


Figure 11: Confocal microscopy images obtained with a Leica SP8 instrument. Cells were stained with Nile Red (red fluorescence) to assess their lipidic droplet accumulation: (A) red fluorescence and (B) bright field, green and red fluorescence overlay of *S. cerevisiae* 59A-GFP pure fermentation. (C) 3D representation of green and red fluorescence overlay of *S. cerevisiae* 59A-GFP.

(D) red fluorescence and (E) bright field and red fluorescence overlay of *L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20. (F) 3D representation of red fluorescence of *L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20. (G) bright field, green and red fluorescence overlay of sequential fermentation.

Regarding to DHE staining, the fluorescence is emitted by particular areas inside cells, forming a network of fluorescence very specific (fig. 12). For *S. cerevisiae* in pure fermentation, the network is well visible with red fluorescence as well as bright field, red and green fluorescence

overlay (fig. 12A and B). The 3D representation of red and green fluorescence overlay shows the network in all the cells (fig. 12C). For *L. thermotolerans* in pure fermentation, the network is very clear and visible with red fluorescence, with bright field and red fluorescence overlay (fig. 12D and E) as well as with the 3D representation (figure 12F). For the sequential fermentation, red fluorescence shows very well the network stained by DHE inside cells (fig. 12G). With bright field, red and green fluorescence overlay it is possible to distinguish *S. cerevisiae* (green and red) and *L. thermotolerans* cells (red) (fig. 12H).

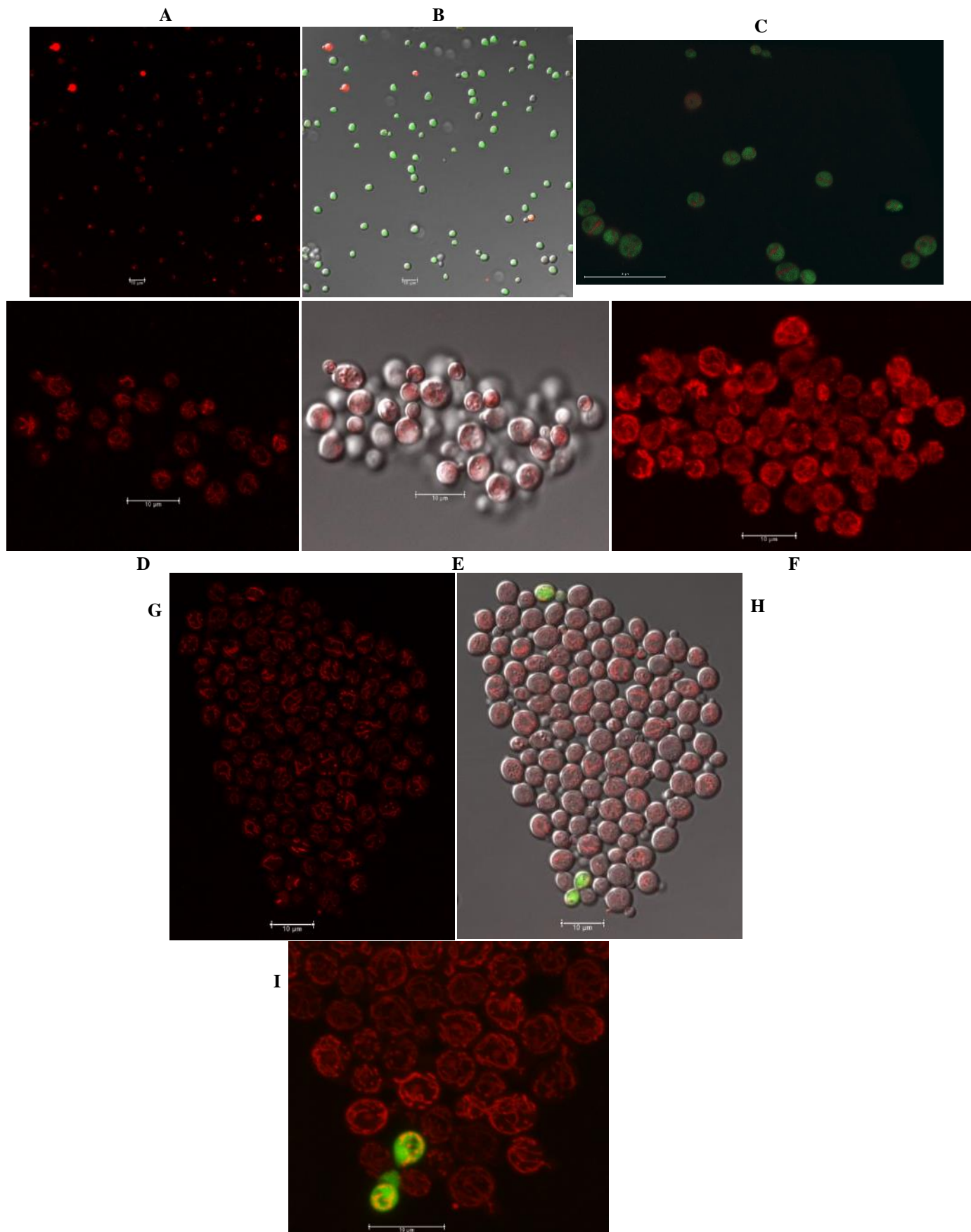


Figure 12: Confocal microscopy images obtained with a Leica SP8 instrument. Cells were stained with DHE (red fluorescence) to assess their ROS accumulation: (A) red fluorescence, (B) bright field, green and red fluorescence overlay of *S. cerevisiae* 59A-GFP. (C) 3D representation of green and red fluorescence of *S. cerevisiae* 59A-GFP. (D) red fluorescence, (E) bright field and red fluorescence overlay, (F) 3D representation of red fluorescence of *L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20, (G) red fluorescence, (H) bright field, red and green fluorescence overlay and (I) 3D representation of red and green fluorescence of the sequential fermentation with *S. cerevisiae* 59A-GFP and *L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20. 87

## Discussion

Mixed fermentations with non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* have been largely described these last years, with a common aim for all: improve wine quality. Indeed, a lot of studies focused on non-*Saccharomyces* aroma modulation in wine in co-fermentations with *S. cerevisiae* to improve wine aroma complexity compared to a wine produced with only *S. cerevisiae* (Albertin et al., 2017; Bely et al., 2008; Charoenchai et al., 1997; Ciani, 1997; Esteve-Zarzoso et al., 1998; Gobbi et al., 2013; González et al., 2018; Jolly et al., 2006; Padilla et al., 2016; Rojas et al., 2001a). However, the use of these non-*Saccharomyces* yeasts can be difficult due to some interactions between them and *S. cerevisiae*, leading sometimes to growth arrest or early die of non-*Saccharomyces* at the beginning of alcoholic fermentations (Ciani et al., 2006; Lleixà et al., 2016; Nissen et al., 2003; Renault et al., 2013; Shekhawat et al., 2017; Wang et al., 2015). Moreover, these negative interactions can also trigger changes on non-*Saccharomyces* metabolism, with a modification or a loss of aromatic molecule production by these yeasts (Sadoudi et al., 2012). Thus, authors tried for several years to understand and describe interaction mechanisms between non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae*, but no studies focused on yeast physiology during alcoholic fermentation.

In this study, an innovative approach is proposed that allow the monitoring of different physiological parameters (namely viability, lipidic droplet and ROS accumulation) in two different species in co-fermentation of grape must. Results obtained with the couple *S. cerevisiae* PB-2023/*S. bacillaris* MCR-9 showed for the first time that it is possible to discriminate each species population with flow cytometry just with yeast size, with or without staining with dyes. Moreover, for other non-*Saccharomyces* yeasts, results obtained with the *S. cerevisiae* modified strain expressing a GFP showed also for the first time that it is good alternative to discriminate *S. cerevisiae* from *L. thermotolerans* cells.

Regarding to cFDA results obtained with both couple of yeast, they are suitable to monitor yeast viability. This dye is used for several years to assess microorganism viability thanks to esterase activity inside cells that cleave ester bonds, releasing fluorescein and relying fluorescence with cell activity and so cell viability (Breeuwer et al., 1995; Dive et al., 1988; Longin et al., 2017). Our results present that with both couple of yeasts, the non-*Saccharomyces* strains have a stable viability during fermentation process but at the end of the sequential fermentation, the viability started to decrease for both yeasts, quicker for *S. bacillaris* than for *L. thermotolerans*. Moreover, the maximum of viable population is lower in the sequential fermentation than pure fermentation for both non-*Saccharomyces* yeasts, in a more extent for *S. bacillaris*. The death of *L. thermotolerans* and *S. bacillaris* at the end of alcoholic fermentation in sequential



fermentations with *S. cerevisiae*, absent in pure fermentation, have been reported in some studies (Balikci et al., 2016; Benito et al., 2016; Englezos et al., 2015, 2019; Nissen et al., 2003). It highlights the sensitivity of non-*Saccharomyces* yeasts and the possible interactions in contact with *S. cerevisiae*. Regarding to *S. cerevisiae*, both strains used in this study present also a maximum of viable cells lower in sequential fermentations compared to pure fermentations, more important in contact with *L. thermotolerans* than *S. bacillaris*. It could easily explain the longer fermentation kinetic with the couple *S. cerevisiae* 59-GFP/*L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20 due to a lower population of *S. cerevisiae* meaning a lower fermentation activity. This lower population of *S. cerevisiae* in presence of *L. thermotolerans* or *S. bacillaris* is not described in other studies and reveal a possible negative interaction maybe due to cell-cell contact that need more investigation.

Nile Red analysis have shown a very low presence of fluorescence intensity inside non-*Saccharomyces* cells for both species during both fermentation conditions, except for *S. bacillaris* in the sequential fermentation after day 15 whose Nile Red fluorescence intensity increase. It suggests that no lipidic droplets accumulation occurs in non-*Saccharomyces* yeasts and the quick increase in *S. bacillaris* cells can be explained by the loss of cell viability that happen at the same time. Contrariwise, *S. cerevisiae* cells present differences in their lipid accumulation, with a lower one in the sequential fermentation with *S. bacillaris* whereas the contact with *L. thermotolerans* increase lipidic accumulation inside *S. cerevisiae* cells compared to pure fermentations. Lipidic droplets are used by yeasts as a storage compartment composed by TriAcylGlycerol (TAG) and Steryl Esters (SE), which can be used for membrane synthesis or energy production (Czabany et al., 2007). The accumulation of these lipidic droplets suggest a stress in cells, with the inability of yeasts to detoxify excess of sterols and/or fatty acids (Mannazzu et al., 2008; Müllner and Daum, 2004). Thus, *S. cerevisiae* cells present a higher lipidic stress in sequential fermentation with *L. thermotolerans*, 3-fold higher than with *S. bacillaris* and the *S. cerevisiae* pure fermentation. This could be linked to the lower viable population of *S. cerevisiae* in contact with *L. thermotolerans* that suggest a negative impact of this non-*Saccharomyces* on *S. cerevisiae* viability and fermentation activity.

Regarding to dyes used, DHE staining results have highlighted a strong ROS accumulation inside *S. cerevisiae* PB-2023 cells for both fermentations, which is not in accordance to studies conducted by Landolfo et al. (2008) and Mendes-Ferreira et al. (2010) on *S. cerevisiae* under enological environment, but not with same strains. In these studies, ROS accumulation occurs mainly at the end of alcoholic fermentation, when ethanol concentration is high. Indeed, ethanol presence during fermentation process has been shown to be a strong oxidant and increase ROS

inside cells (Carmona-Gutierrez et al., 2010; Landolfo et al., 2008; Moradas-Ferreira and Costa, 2013). Our results showed that the modified strain *S. cerevisiae* 59A-GFP present a lower ROS accumulation than PB-2023 strain during all the fermentation process in both conditions, independently of non-*Saccharomyces* yeast presence. This difference could be explained by the media used which were not the same and then can affect differently each strain as shown previously by some studies (Mannazzu et al., 2008; Taillandier et al., 2014). Indeed, the composition of the medium is able to modify yeast metabolism and in our case, the concentration of nitrogen sources is different in each medium, with 170 mg.L<sup>-1</sup> in the standardized grape juice and 273 mg.L<sup>-1</sup> in the Chardonnay must. Nitrogen sources are very important nutrients that affect yeast growth and fermentation kinetic (Alexandre and Charpentier, 1998; Bell and Henschke, 2005; Gobert et al., 2017; Sablayrolles et al., 1996; Taillandier et al., 2007; Wang et al., 2003), but no studies focused on a link between nitrogen and ROS production in yeasts. Thus, ROS accumulation in both *S. cerevisiae* strains seems not to be due to ethanol nor non-*Saccharomyces* presence even if the high proportion of cells positive to DHE reflects a high concentration of superoxide anion. About non-*Saccharomyces* yeasts, a ROS accumulation can be observed after the end of alcoholic fermentation for *S. bacillaris*, which could be explained by the cell viability decrease and unfavorable environment, whereas *L. thermotolerans* present a ROS accumulation quite constant during fermentations without difference between both conditions. It suggests that the presence of *S. cerevisiae* doesn't trigger oxidative stress in the non-*Saccharomyces* yeasts used in this study.

A verification of these dyes by fluorescence microscopy is needed to validate them for future experiments. Thus, confocal microscopy images confirmed the staining of lipidic droplets inside *L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20 and *S. cerevisiae* 59A-GFP as expected. Regarding to DHE staining, it appears that mitochondrial DNA is the target of this dye after its oxidation by ROS as shown by the mitochondrial network visible on confocal microscopy images which is correlated with other studies about mitochondrial DNA staining (Kitagaki and Shimoi, 2007; Kitagaki and Takagi, 2014; McFaline-Figueroa et al., 2011). Regarding to cFDA, confocal microscopy confirms the difficulty to use this dye with a GFP strain because of the too near emission spectrum of these fluorochromes.

## Conclusion

In this study, a new flow cytometry protocol was successfully applied to two non-*Saccharomyces* strains and two *S. cerevisiae* strains to monitor few physiological parameters during alcoholic fermentation of fermentable medium (grape juice or white must). On one hand,

discrimination of non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* by flow cytometry were presented, thanks to size for the couple *S. cerevisiae*/*S. bacillaris* or with the use of a modified *S. cerevisiae* strain expressing a GFP for the couple *S. cerevisiae*/*L. thermotolerans*. On the other hand, three physiological dyes were validated to follow yeast viability with cFDA, lipid accumulation as lipidic droplets with Nile Red and ROS accumulation with DHE. Thus, this method can be applied to study interactions between non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* during alcoholic fermentation to give physiological information about the nature of these interactions.

## Acknowledgments

We thank the other members of the laboratory for their help and skill assistance as well as the Dimacell Imaging Facility, Agrosup Dijon, INRA, INSERM, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon France for confocal microscopy analyses, especially Christine Arnould and Elodie Noirot for their assistance.

This work was supported by the Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation and the Fond Européen De Développement Régional (FEDER) through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 programs.

## References

- Albertin, W., Zimmer, A., Miot-Sertier, C., Bernard, M., Coulon, J., Moine, V., Colonna-Ceccaldi, B., Bely, M., Marullo, P., Masneuf-Pomarede, I., 2017. Combined effect of the *Saccharomyces cerevisiae* lag phase and the non-*Saccharomyces* consortium to enhance wine fruitiness and complexity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 7603–7620. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8492-1>
- Alexandre, H., Charpentier, C., 1998. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 20–27.
- Andorra, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., Mas, A., 2011. Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. *Food Microbiol.* 28, 1483–1491. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.009>
- Balikci, E.K., Tanguer, H., Jolly, N.P., Erten, H., 2016. Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. *Yeast* 33, 313–321. <https://doi.org/10.1002/yea.3166>
- Bell, S.-J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 242–295.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdiou, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspota delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>
- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., Benito, S., 2016. Quality and Composition of Airén Wines Fermented by Sequential Inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* 54, 135–144. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.02.16.4220>
- Breeuwer, P., Drocourt, J.L., Bunschoten, N., Zwietering, M.H., Rombouts, F.M., Abee, T., 1995. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1614–1619.
- Capusoni, C., Arioli, S., Zambelli, P., Moktaduzzaman, M., Mora, D., Compagno, C., 2016. Effects of oxygen availability on acetic acid tolerance and intracellular pH in *Dekkera bruxellensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.00515-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.00515-16>

- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., Madeo, F., 2010. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ.* 17, 763–773. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.219>
- Charoenchai, C., Fleet, G. h., Henschke, P. a., Todd, B. e. n. ., 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 3, 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x>
- Ciani, M., 1997. Role, enological properties and potential biotechnological use of non-*Saccharomyces* wine yeasts [WWW Document]. URL [https://www.researchgate.net/profile/Maurizio\\_Ciani/publication/284677825\\_Role\\_enological\\_properties\\_and\\_potential\\_use\\_of\\_non-Saccharomyces\\_wine\\_yeasts/links/565eb5b908ae1ef92983e4b3.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Maurizio_Ciani/publication/284677825_Role_enological_properties_and_potential_use_of_non-Saccharomyces_wine_yeasts/links/565eb5b908ae1ef92983e4b3.pdf) (accessed 8.22.16).
- Ciani, M., Beco, L., Comitini, F., 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Czabany, T., Athenstaedt, K., Daum, G., 2007. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids, Regulation of Lipid Metabolism in Yeast* 1771, 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.001>
- Dive, C., Cox, H., Watson, J.V., Workman, P., 1988. Polar fluoescien derivatives as improved substrate probes for flow cytoenzymological assay of cellular esterases. *Mol. Cell. Probes* 2, 131–145. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(88\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0890-8508(88)90035-7)
- Englezos, V., Rantsiou, K., Giacosa, S., Río Segade, S., Rolle, L., Cocolin, L., 2019. Cell-to-cell contact mechanism modulates *Starmerella bacillaris* death in mixed culture fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 289, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.009>
- Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., Cocolin, L., 2015. Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations. *Int. J. Food Microbiol.* 199, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.009>
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramon, D., Querol, A., 1998. The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *Int. Microbiol.* 1, 143–148.
- Fleet, G.H., 1993. *Wine Microbiology and Biotechnology*. CRC Press.
- Ganini, D., Leinisch, F., Kumar, A., Jiang, J., Tokar, E.J., Malone, C.C., Petrovich, R.M., Mason, R.P., 2017. Fluorescent proteins such as eGFP lead to catalytic oxidative stress in cells. *Redox Biol.* 12, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.002>
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Crespo, J., Cabellos, J.M., Arroyo, T., 2017. Yeast Monitoring of Wine Mixed or Sequential Fermentations Made by Native Strains from D.O. “Vinos de Madrid” Using Real Time Quantitative PCR. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02520>
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* 33, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
- Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Alexandre, H., 2017. Non-*Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences: Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02175>
- González, B., Vázquez, J., Morcillo-Parra, M.Á., Mas, A., Torija, M.J., Beltran, G., 2018. The production of aromatic alcohols in non-*Saccharomyces* wine yeast is modulated by nutrient availability. *Food Microbiol.* 74, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.003>
- Greenspan, P., Mayer, E.P., Fowler, S.D., 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* 100, 965–973. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>
- Heim, R., Tsien, R.Y., 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.* 6, 178–182. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00450-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00450-5)
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, Á., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006. Real-Time Quantitative PCR (QPCR) and Reverse Transcription-QPCR for Detection and Enumeration of Total Yeasts in Wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7148–7155. <https://doi.org/10.1128/AEM.00388-06>
- Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., Arneborg, N., 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 541–547.
- Jolly, J., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., others, 2006. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 27, 15.
- Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S., 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 14, 215–237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>

- Kalyanaraman, B., Zielonka, J., 2017. Green fluorescent proteins induce oxidative stress in cells: A worrisome new wrinkle in the application of the GFP reporter system to biological systems? *Redox Biol.* 12, 755–757. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.019>
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., Nerantzis, E., 2006. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 735–739. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9283-5>
- Kemsawasd, V., Branco, P., Almeida, M.G., Caldeira, J., Albergaria, H., Arneborg, N., 2015. Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, fnv103. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv103>
- Kitagaki, H., Shimoi, H., 2007. Mitochondrial dynamics of yeast during sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 227–230. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.227>
- Kitagaki, H., Takagi, H., 2014. Mitochondrial metabolism and stress response of yeast: Applications in fermentation technologies. *J. Biosci. Bioeng.* 117, 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.09.011>
- Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D., Mannazzu, I., 2008. ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1780, 892–898. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.008>
- Liu, P.-T., Lu, L., Duan, C.-Q., Yan, G.-L., 2016. The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Sci. Technol.* 71, 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.031>
- Lleixà, J., Manzano, M., Mas, A., Portillo, M. del C., 2016. *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Competition during Microvinification under Different Sugar and Nitrogen Conditions. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01959>
- Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., Alexandre, H., 2017. Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiol.* 62, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.023>
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.*, 23rd International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY-23) 86, 23–50. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00246-0)
- Mannazzu, I., Angelozzi, D., Belviso, S., Budroni, M., Farris, G.A., Goffrini, P., Lodi, T., Marzona, M., Bardi, L., 2008. Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: Cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.003>
- Marsit, S., Mena, A., Bigey, F., Sauvage, F.-X., Couloux, A., Guy, J., Legras, J.-L., Barrio, E., Dequin, S., Galeote, V., 2015. Evolutionary Advantage Conferred by an Eukaryote-to-Eukaryote Gene Transfer Event in Wine Yeasts. *Mol. Biol. Evol.* 32, 1695–1707. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv057>
- McFaline-Figueroa, J.R., Vevea, J., Swayne, T.C., Zhou, C., Liu, C., Leung, G., Boldogh, I.R., Pon, L.A., 2011. Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother–daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging Cell* 10, 885–895. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00731.x>
- Mendes-Ferreira, A., Sampaio-Marques, B., Barbosa, C., Rodrigues, F., Costa, V., Mendes-Faia, A., Ludovico, P., Leão, C., 2010. Accumulation of Non-Superoxide Anion Reactive Oxygen Species Mediates Nitrogen-Limited Alcoholic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7918–7924. <https://doi.org/10.1128/AEM.01535-10>
- Mora, J., Barbas, J.I., Mulet, A., 1990. Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 156–159.
- Moradas-Ferreira, P., Costa, V., 2013. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Rep.*
- MüLLNER, H., Daum, G., 2004. Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim. Pol.* 51, 323–347.
- Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell–cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20, 331–341. <https://doi.org/10.1002/yea.965>
- Padilla, B., Gil, J.V., Manzanares, P., 2016. Past and Future of Non-*Saccharomyces* Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Food Microbiol.* 411. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
- Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., Girio, F., 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.012>
- Renault, P.E., Albertin, W., Bely, M., 2013. An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4105–4119. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4660-5>

- Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, F., Manzanares, P., 2001. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 283–289. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00552-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00552-9)
- Sablayrolles, J.-M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.-L., Barre, P., 1996. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 377–381. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89154-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89154-9)
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H., 2012. Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol.* 32, 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>
- Shekhawat, K., Bauer, F.F., Setati, M.E., 2017. Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2479–2491. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8001-y>
- Simonin, S., Alexandre, H., Nikolantonaki, M., Coelho, C., Tourdot-Maréchal, R., 2018. Inoculation of *Torulaspora delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking. *Food Res. Int.* 107, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.034>
- Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., Brandam, C., 2014. Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1959–1967. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1618-z>
- Taillandier, P., Ramon Portugal, F., Fuster, A., Strehaiano, P., 2007. Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiol.* 24, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.002>
- Viana, F., Gil, J.V., Genovés, S., Vallés, S., Manzanares, P., 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol.* 25, 778–785. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.015>
- Wang, C., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., 2015. Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 206, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.022>
- Wang, X.D., Bohlscheid, J.C., Edwards, C.G., 2003. Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *J. Appl. Microbiol.* 94, 349–359.
- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-Martins, I., Gírio, F., 2006. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.025>

### 1.2. Optimisation du protocole de marquage à l'Iodure de Propidium (IP)

La mise en place du protocole de cytométrie en flux pour analyser certains paramètres physiologiques des levures a mis en évidence la difficulté d'utiliser le cFDA pour dénombrer les cellules viables avec la souche de *S. cerevisiae* exprimant la GFP. En effet, l'émission de fluorescence verte étant trop similaire, il n'est pas possible de distinguer chaque fluorochrome et donc de quantifier les cellules viables. C'est pourquoi l'utilisation de l'iodure de propidium (IP) a été envisagée pour remplacer le cFDA comme marqueur de viabilité. L'IP est un fluorochrome non fluorescent en solution, et capable de passer la membrane des cellules uniquement si celle-ci est endommagée. Il permet donc de renseigner sur l'intégrité membranaire des cellules, les cellules IP positives (IP+) sont alors considérées comme mortes et les cellules IP négatives (IP-) comme viables (Delobel et al., 2012). Cependant, la présence d'éthanol pendant la fermentation alcoolique a été rapportée comme pouvant donner de faux positifs à cause de la fluidification membranaire induite par l'éthanol (Davey and Hexley, 2011). Nous avons donc vérifié la corrélation entre la cultivabilité obtenue sur boîtes de Petri avec le milieu YPD et un marquage à l'IP (viabilité obtenue avec les cellules IP-) avec la souche *S. cerevisiae* 59A-GFP pendant une fermentation en jus de raisin standardisé, pendant 30 jours (fig. X). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux méthodes pour obtenir la viabilité des cellules (test T de Student,  $p$ -value < 0,05), permettant de conclure que l'IP peut être utilisé pendant la fermentation alcoolique pour dénombrer les cellules viables comme décrit précédemment (Chasseriaud et al., 2018; Tesnière et al., 2013).

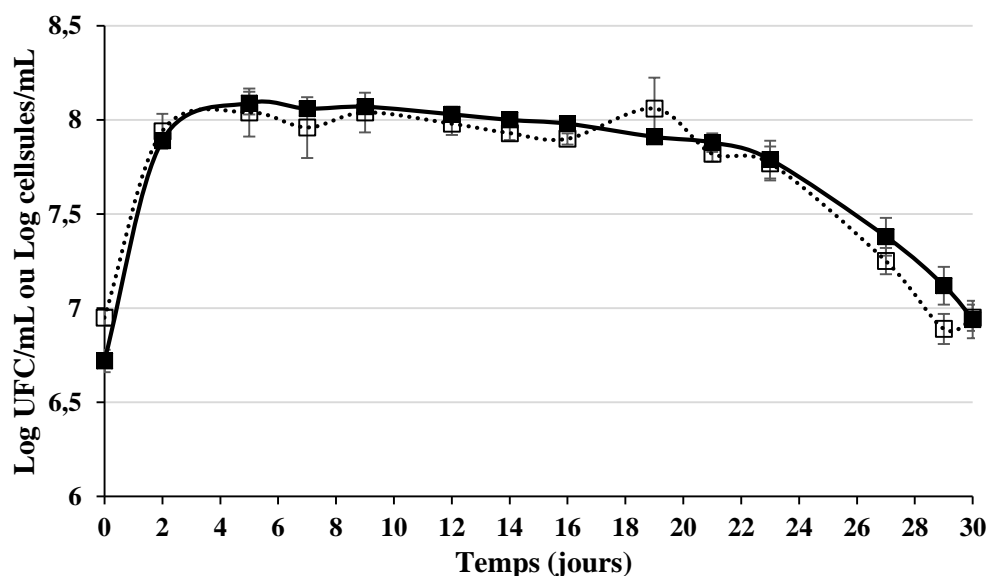


Figure 10 : Dénombrements des cellules viables de *S. cerevisiae* 59A-GFP par marquage à l'iodure de propidium (IP, cellules viables = IP négatives) ou sur boîtes de Petri (milieu YPD) en fermentations pures à 20 °C dans du jus de raisin standardisé : ■ cellules IP négatives et □ dénombrement sur boîtes de Petri.

## 2. Influence du contact cellule-cellule sur les interactions levure-levure et l'exo-metabolome

### Résumé de la publication scientifique :

Les validations des marqueurs fluorescents pour l'étude de la physiologie levurienne en cytométrie de flux ayant été effectuées précédemment, nous avons souhaité étudier les interactions pouvant exister entre *S. cerevisiae* et *L. thermotolerans*, en réalisant des fermentations pures et en les comparant avec des fermentations séquentielles de 24 h avec ou sans séparation physique par une membrane de dialyse. Cette séparation a permis d'étudier le contact cellule-cellule, une interaction négative reportée à plusieurs reprises par d'autres études entre ces deux espèces. Les cinétiques fermentaires ont été suivies pour chaque fermentation par spectrométrie à transformée de Fourier avec un OenoFOSS™. Pour chaque fermentation, un suivi physiologique des levures a été réalisé par cytométrie en flux en utilisant trois marqueurs fluorescents : l'iodure de propidium pour la viabilité des cellules, le Nile Red pour détecter une accumulation de particules lipidiques dans les cellules et le DHE pour détecter une accumulation de ROS dans les cellules. Différents suivis ont aussi été réalisés sur ces fermentations : la consommation de l'oxygène dissout par les levures pour les deux fermentations séquentielles, la consommation de « Yeast Assimilable Nitrogen » (YAN) par *L. thermotolerans* et la consommation de phytostérols pendant les premières 24 h de fermentation par *L. thermotolerans*. De plus, les composés volatils présents en fin de fermentation ont été dosés par HS-SPME-GC/MS et l'exo-métabolome de chaque fermentation a été analysé par FT-ICR-MS.

La fermentation pure de *L. thermotolerans* présente une cinétique de 21 jours, plus lente que celle de *S. cerevisiae* avec seulement 9 jours. Quant aux deux fermentations séquentielles, elles présentent une cinétique de 14 jours, se situant donc entre les deux cinétiques des fermentations pures. Cela implique un effet négatif de *L. thermotolerans* sur *S. cerevisiae* confirmant l'existence d'interactions entre ces deux espèces.

L'étude physiologique par cytométrie en flux des cellules en fermentations a montré une population viable de *S. cerevisiae* plus faible dans les deux fermentations séquentielles par rapport à la fermentation pure. De plus, la population de *S. cerevisiae* viable est la plus faible pendant la fermentation séquentielle avec contact malgré une cinétique fermentaire identique à la fermentation séquentielle sans contact, suggérant une influence du contact cellule-cellule sur la biomasse. L'activité fermentaire plus faible pendant la fermentation séquentielle sans contact



démontre plutôt une forte compétition pour les nutriments puisqu'il y a plus de biomasse. Le suivi de l'accumulation des ROS a montré que la quantité de ROS intracellulaires augmente surtout lorsque le milieu devient défavorable en fin de fermentation. Exception est faite de *S. cerevisiae* dans la fermentation séquentielle avec contact, dont l'accumulation de ROS est plus lente que dans les autres conditions suggérant un effet positif du contact cellule-cellule avec *L. thermotolerans*. En revanche, l'augmentation forte de ROS dans les cellules de *L. thermotolerans* dans les deux fermentations séquentielles montre l'inaptitude de cette non-*Saccharomyces* à s'adapter à une fermentation rapide comparée à la fermentation pure.

La consommation de l'oxygène dissout, des phytostérols du moût et des sources azotées durant les premières heures de fermentation par *L. thermotolerans*, avant l'inoculation de *S. cerevisiae*, a mis en évidence une forte compétition pour ces nutriments au détriment de *S. cerevisiae*. Cette compétition peut expliquer en partie la diminution de la biomasse et de la viabilité observée chez *S. cerevisiae* en fermentation séquentielle avec *L. thermotolerans*, accentuée par le contact cellule-cellule dans la fermentation séquentielle sans séparation. Il apparaît que cette interaction négative impacte la production de composés volatils, avec notamment une diminution de la production d'esters et d'alcools supérieurs dans les fermentations séquentielles comparée aux fermentations pures des deux espèces. Le contact entre *S. cerevisiae* et *L. thermotolerans* semble être ici aussi négatif avec une diminution de la concentration en esters plus importante dans la fermentation séquentielle sans séparation.

La dernière partie de cette étude a porté sur l'analyse de l'exo-métabolome des différentes conditions de fermentation par spectrométrie de masse à transformée de Fourier. Le profil métabolique de la fermentation pure de *S. cerevisiae* et de la fermentation séquentielle sans séparation sont très proches, alors que la fermentation pure de *L. thermotolerans* et la fermentation séquentielle avec séparation forme chacune un profil bien distinct des autres. L'extraction de biomarqueurs pour chaque fermentation a permis de montrer l'apport spécifique de chaque espèce de levure en termes de métabolites. L'identification de certains biomarqueurs a été possible et a mis en évidence l'implication de certaines voies métaboliques notamment le métabolisme des glucides, des nucléotides ou encore des acides aminés.

Ainsi, cette étude apporte de nouvelles connaissances sur les interactions ayant lieu entre *S. cerevisiae* et *L. thermotolerans* pendant la fermentation alcoolique du moût de raisin.

**Influence of cell-cell contact on yeast interactions and the exo-metabolome.**

Clément Petitgonnet<sup>\*,a</sup>, Géraldine L. Klein<sup>a</sup>, Chloé Roullier-Gall<sup>a</sup>, Philippe Schmitt-Kopplin<sup>bc</sup>, Stefania Vichi<sup>d</sup>, Diane Julien-David<sup>e</sup> and Hervé Alexandre<sup>a</sup>

<sup>a</sup> UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe VALMiS (Vin, Aliment, Microbiologie, Stress), AgroSup Dijon – Université de Bourgogne Franche-Comté, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, rue Claude LADREY, BP 27877, 21000 DIJON, France

<sup>b</sup> Helmholtz Zentrum Muenchen, Research unit Analytical BioGeoChemistry, Ingolstaedter Landstrasse 1, 85764 Neuherberg, Germany

<sup>c</sup> Technische Universität Muenchen, Analytical Food Chemistry, Maximus-von-Imhof-Forum 2, 85354 Freising, Germany

<sup>d</sup> Nutrition, Food Science and Gastronomy Department, INSA - XaRTA (Catalonian Reference Network on Food Technology), University of Barcelona, Santa Coloma de Gramenet, Spain

<sup>e</sup> Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Faculté de Pharmacie, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

\*: corresponding author [clement.petitgonnet@gmail.com](mailto:clement.petitgonnet@gmail.com)

**Summary:**

Sequential fermentation of grape must inoculated with *L. thermotolerans* and then *S. cerevisiae* 24 h later (typical wine-making practice) was conducted with or without cell-cell contact between the two yeast species. We monitored cell viability of the two species throughout fermentation by flow cytometry. The cell viability of *S. cerevisiae* decreased under both conditions, but the decrease was greater if there was cell-cell contact. An investigation of the nature of the interactions showed competition between the two species for nitrogen compounds, oxygen, and, for the first time, must phytosterols. Volatile-compound analysis showed differences between sequential and pure fermentation and that cell-cell contact modifies yeast metabolism, as the volatile-compound profile was significantly different from that of sequential fermentation without cell-cell contact. We further confirmed that cell-cell contact modifies yeast metabolism by analyzing the exo-metabolome of all fermentations by FT-ICR-MS analysis. These analyses show specific metabolite production and quantitative metabolite changes associated with each fermentation condition. This study shows that cell-cell contact not only affects cell viability, as already reported, but markedly affects yeast metabolism.

**Keywords:** interactions, *S. cerevisiae*, *L. thermotolerans*, cell-cell contact, flow cytometry, metabolomics.

## Introduction

Alcoholic fermentation in grape must is mainly performed by the well-known yeast *Saccharomyces cerevisiae*. However, *S. cerevisiae* is not the only yeast present on grape berries and in grape must. Other interesting yeasts, called non-*Saccharomyces*, are increasingly being studied because of their ability to improve the complexity of the wine aroma by increasing the concentration of certain aromatic molecules, such as terpenoids or higher alcohols (Ciani, 1997; Esteve-Zarzoso et al., 1998; Rojas et al., 2001; Jolly et al., 2006; Fleet, 2008; Benito, 2018; Zhang et al., 2018), or other molecule of interest, such as glycerol (Romano et al., 1992; Barbosa et al., 2015). The production of these molecules is mostly due to enzymatic activities present in non-*Saccharomyces* yeasts, which are lower or absent from *S. cerevisiae* strains (Esteve-Zarzoso et al., 1998; Strauss et al., 2001; Jolly et al., 2014). *L. thermotolerans* is naturally present in grape must (Torija et al., 2001; Kapsopoulou et al., 2005) and has been reported to enhance the overall acidity of wine due to the high production of L-lactic acid (Mora et al., 1990; Gobbi et al., 2013). This characteristic may be desirable for wine with a low acidity (Balikci et al., 2016). Moreover, *L. thermotolerans* is able to increase the concentration of interesting aromatic molecules in co-fermentation with *S. cerevisiae* than when *S. cerevisiae* is used alone. These molecules include ethyl esters and terpenes (Benito et al., 2015; Balikci et al., 2016; Benito et al., 2016), as well as glycerol (Kapsopoulou et al., 2006). The biotechnological interest of co-fermentation with non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* in wine making is now clear (García et al., 2016), but co-fermentation is not well controlled. Indeed, the presence of non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* during alcoholic fermentation leads to interactions between these different species (Ciani et al., 2016) which are highly dependent on the species and strains used (Wang et al., 2016). Among such interactions, competition for nutrients, such as nitrogen and oxygen, can be among the earliest that occur during co-fermentation, especially in sequential fermentations (inoculation with *S. cerevisiae* a minimum of 24 h after inoculation with the non-*Saccharomyces* yeast). Indeed, the non-*Saccharomyces* consume nutrients before *S. cerevisiae* inoculation, leading sometimes to sluggish fermentation (Sablayrolles et al., 1996; Alexandre and Charpentier, 1998; Taillandier et al., 2007). Among these nutrients, phytosterols may be good candidates to study these interactions. Indeed, under conditions of aerobiosis, yeast are able to synthesis unsaturated fatty acids (UFA) and sterols for membrane integrity and energy production, with a succession of reactions involving oxygen-dependent enzymes (Tehlivets et al., 2007). However, in the absence of oxygen, these enzymes are not active and yeast use the fatty acids and sterols present in the must (Salmon, 2006). It is important to know the proportion of the phytosterols consumed

by non-*Saccharomyces* before inoculation with *S. cerevisiae* when performing sequential fermentation.

Competition for nutrients is not the only interaction that occurs during alcoholic fermentation, because direct physical contact between non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* cells could lead to cell-cell interactions. Indeed, several studies have shown early growth arrest of *Lachancea thermotolerans* in co-fermentations with *S. cerevisiae*. They concluded that this is due to a cell-cell contact mechanism (Nissen and Arneborg, 2003; Nissen et al., 2003), whereas Albergaria et al. (2009) and Branco et al. (2014) showed that antimicrobial peptide secretion is responsible for the early death of this non-*Saccharomyces* yeast. Several other molecules are involved in yeast-yeast interactions and affect the growth of yeast, such as tyrosol, tryptophol, and phenylethanol, which are *quorum sensing* molecules, especially under nitrogen-limiting conditions (Zupan et al., 2013; González et al., 2018; Valera et al., 2019). Additional interaction mechanisms have been reported and reviewed recently (Liu et al., 2015). Although cell-cell contact may explain some interactions between yeast, the effect of cell-cell contact on yeast metabolism relative to when the different species are physically separated has never been investigated.

Here, we exhaustively studied the interactions between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* by comparing pure fermentations of each species with sequential fermentation, with and without their physical separation. The competition for yeast assimilable nitrogen (YAN), oxygen, and phytosterols was also studied. We analyzed the consequences of such interactions on volatile compound profiles and report, for the first time, their impact on the exo-metabolome.

## Materials and methods

### Yeast strains

A modified *S. cerevisiae* strain supplied by INRA/SupAgro Montpellier was used in this study: *S. cerevisiae* 59A-GFP MATa ho *AMN1::TEF2Pr-GFP-ADH1-NATMX4*, a haploid derivative of the commercial wine strain EC1118, modified to strongly express eGFP(S65T) (Marsit et al., 2015).

*L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20 (previously isolated and identified by Sadoudi et al. (2012)) was used as the non-*Saccharomyces* yeast strain.

### Growth conditions

All yeast strains were grown at 28°C in modified YPD medium (20 g.L<sup>-1</sup> glucose, 10 g.L<sup>-1</sup> peptone, and 5 g.L<sup>-1</sup> yeast extract with 18 g.L<sup>-1</sup> of agar for Petri dish cultivation), supplemented with 0.1 g.L<sup>-1</sup> chloramphenicol. For fermentation inoculation, yeasts were pre-cultured in 250-mL sterile Erlenmeyer flasks, closed with dense cotton plugs, containing 150 mL modified YPD medium and incubated with agitation (100 rpm) at 28°C for 24 or 48 h.

### Fermentation conditions

Fermentations were carried out in triplicate in white must containing  $212.1 \pm 4.81$  g.L<sup>-1</sup> glucose/fructose, pH  $3.41 \pm 0.02$ , as well as  $251.2 \pm 20.5$  mg.L<sup>-1</sup> total assimilable nitrogen. The must was centrifuged at 7,000 x g for 7 min at 4°C before use. Sugar concentration and ethanol production were monitored by Fourier transformed infra-red spectroscopy (FTIR, OenoFOSS™, FOSS, Hilleroed, Denmark). The detection cell was filled with 200 µL centrifuged (12,000 g for 5 min at 4°C) supernatant from cultures and the analysis run using FOSS User Interface software.

#### Pure fermentations

Pure fermentations were carried out in 1-L test tubes containing 800 mL white must and closed with specific silicon caps. Each test tube was inoculated with 10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> from a YPD-medium pre-culture of *S. cerevisiae* or *L. thermotolerans* and incubated at 20°C without agitation.

#### Sequential fermentations in flasks

Sequential fermentations were carried out in 2-L pasteurized (2 h at 70°C) test tubes, closed with specific silicon caps. Two different fermentation conditions were tested: without (i) and with (ii) cell-cell contact.

- i. Three test tubes were filled with 1.2 L white must and a dialysis membrane (Spectra/por, Spectrum Labs, MWCO 12-14 kDa, diameter 48 mm, length 60 cm) containing 600 mL white must was added to each test tube (total must volume 1.8 L). The dialysis membranes were inoculated with 10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> *L. thermotolerans* from YPD pre-cultures, and the test tubes (external medium) inoculated 24 h later with 10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> of *S. cerevisiae* from a YPD pre-culture.
- ii. Three test tubes were filled with 1.8 L white must (no dialysis membrane), inoculated with 10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> *L. thermotolerans*, and then 24 h later with 10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup> *S. cerevisiae*, both from YPD pre-cultures.

All test tubes were incubated at 20°C without agitation.

### Flow cytometric analysis

#### Yeast viability

All fluorescent dyes used in this study were purchased from ThermoFisher Scientific, Invitrogen.

Yeast viability was monitored during fermentation with propidium iodide (PI) dye (maximum excitation/emission wavelengths 538/617 nm), which binds to DNA when the cell membrane is compromised, triggering its fluorescence. Fermenting yeast (1 mL) was centrifuged at 12,000 x g for 5 min at 4°C. The pellet was resuspended in 1 mL PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, and 11.9 mM Phosphate, pH 7.2) (Fisher Scientific, Illkirch, France) and serial dilutions prepared. PI (1 µL at 0.1 mg.mL<sup>-1</sup> in water) was added to a 100 µL aliquot. Samples were incubated 10 min in the dark and analyzed by flow cytometry.

#### Flow cytometer settings

Flow cytometry was performed with a BD Accuri C6 flow cytometer and the data analyzed using BD Accuri C6 software. For each run, 20 µL of sample was analyzed at 34 µL.min<sup>-1</sup>, with a FSC threshold of 80,000, and SSC-H/FSC-H plots analyzed using logarithmic axes. A 488-nm wavelength argon laser was used to excite the cells (autofluorescence) and dye. An FL3-H long-pass filter (675 nm) was used for PI fluorescence.

### Quantification of amino acids and oxygen

Oxygen consumption during alcoholic fermentation was monitored using Pst3 sensors (Nomacorc<sup>®</sup>) placed at the inner face at the top of the test tubes. The oxygen concentration was read using a NomaSense<sup>™</sup> O2 P300 device (Nomacorc<sup>®</sup>), following the manufacturer's instructions. The oxygen concentration was measured in triplicate before stirring the media in the test tubes.

Amino acids and ammonium were quantified by HPLC as described previously (Gobert et al., 2017).

### Phytosterol quantification by Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS)

Must samples (50 mL) were taken at T0 and T24 h, corresponding to the must without yeast and 24 h of fermentation by *L. thermotolerans*, respectively. Prior to extraction, 250 µL of

cholesterol (Sigma-Aldrich, Merck, Germany) at  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  in ethyl acetate (Sigma-Aldrich, Merck, Germany) was added in must samples. Must samples were transferred to a separatory funnel, 25 mL of chloroform (Biosolve Chimie, France) added, the samples well agitated, and the organic lower phase collected. This step was repeated three times and the organic phases were combined. To eliminate remaining water, anhydrous sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  powder, Sigma-Aldrich, Merck, Germany) was added. Samples were transferred to 250 mL glass balloons and the solvent evaporated with a rotary vacuum evaporator to reduce the volume to approximately 1 mL. This volume was transferred to 1-mL brown-glass vials and completely evaporate under an  $\text{N}_2$  flux. A cold saponification was done by adding 900  $\mu\text{L}$  of absolute ethanol (Carlo Erba, France) and 250  $\mu\text{L}$  of a saturated potassium hydroxide (KOH, Merck Darmstadt, Germany) aqueous solution into each vial. Samples were purged with nitrogen, and was put into a rotary shaker (Edmund Buhler, Johanna Otta GmbH, Hechingen, Germany) at ambient temperature in the dark overnight (15 h). The solution was transferred in a 100 mL separation funnel and 10 mL of distilled water were added. The unsaponifiable fraction was extracted three time with 2 mL of diethyl ether (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The combined organic extracts were removed with a rotary vacuum evaporator and the residue was dried under nitrogen flow. After additional 2 mL of diethyl ether, the unsaponifiable residue was carefully transferred to a 2 mL glass test tube and then evaporated to dry matter under nitrogen flow. Then the sterol residue was converted to trimethylsilyl (TMS, Sigma-Aldrich, Merck, Germany) ethers with 100  $\mu\text{L}$  of pyridine and 100  $\mu\text{L}$  of N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA, Sigma-Aldrich, Merck, Germany) at room temperature in the dark overnight and then, diluted with 800  $\mu\text{L}$  of isooctane (Sigma-Aldrich, Merck, Germany). One microliter of each sample was injected into the GC-MS system. Phytosterol analyses were performed on a GC-MS device, composed of a Varian STAR 3400 GC instrument equipped with an “on-column” injector coupled to a mass spectrometer (Saturn 2000, Varian, France) with Electronic Impact as an ionization source (EI, ionization energy of 70 eV), working with a mass range from 40 to 600 m/z. Data acquisition and processing were performed with Varian Saturn Work Station 5.11 software using the NIST mass spectral database for compound identification. The separation of each compound was performed with a capillary column Factor Four VF-5ms (stationary phase: 5% phenyl-95% dimethylpolysiloxane, thickness of 0.1  $\mu\text{m}$ , 60 m x 0.25 mm, Varian, France). Initial temperature of the column was  $50^\circ\text{C}$  (maintained for 2 min). The column temperature was programmed to reach  $105^\circ\text{C}$  at a rate of  $7^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  (maintained for 2 min), then  $170^\circ\text{C}$  at a rate of  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  (maintained for 2 min), and finally  $320^\circ\text{C}$  at a rate of  $7^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  (maintained for 15 min). The

injector temperature was set to 50°C and programmed to reach 300°C at a rate of 100°C.min<sup>-1</sup> and kept at this temperature until the end of analysis. The injected volume was set to 1 µL and was under the control of an automatic injector (8500, Varian, France). The carrier gas was Helium (99,9995%, Air liquid, France) and was set to a flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup>. Sterols were quantified against cholesterol as an internal standard.

#### Volatile compounds quantification

Volatile compounds were quantified by HeadSpace-Solid Phase MicroExtraction-Gas Chromatography/Mass Spectrometry (HS-SPME-GC/MS) as reported previously (Gobert et al., 2017). Briefly, 2 mL of wine was placed in a 10-mL vial fitted with a silicone septum, which was then transferred to a silicon oil bath at 40°C and the sample incubated for 10 min with magnetic stirring (700 rpm). A divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was exposed to the sample headspace for 30 min and then subjected to immediate desorption in the gas chromatography injector set at 260°C. Volatile compounds were analyzed by gas chromatography coupled to a quadrupolar mass-selective spectrometer. GC-MS analysis was performed in complete scanning mode (SCAN), in the 30–300 mass units range. Compounds were identified by comparing their mass spectra and retention times with those of standard compounds or with those available in the Wiley 6 mass spectrum library or reported in previous publications.

#### Metabolomic: Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance-Mass Spectrometry (FT-ICR-MS)

##### *FT-ICR-MS metabolome profiling*

Direct-infusion FT-ICR mass spectra were acquired with a 12 Tesla Bruker Solarix FT-ICR mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The samples were diluted 2:100 (v/v) in methanol (LC-MS grade, Fluka, Germany). Quality control (QC) samples were prepared by pooling equal amounts of all samples. QC samples were analyzed at the beginning and after every 10 samples to monitor the reproducibility of the measurements. QC spectra showed good repeatability and reproducibility of the method (spectrum profiles were very similar between each QC) with a very low coefficient of variation (supp fig. 1). The diluted samples and QC samples were infused into the electrospray ion source at a flow rate of 2 µL.min<sup>-1</sup>. Settings for the ion source were: drying gas temperature, 180°C; drying gas flow, 4.0 L.min<sup>-1</sup>; capillary voltage, 3600 V. The spectra were acquired with a time-domain of 4



megawords and 300 scans were accumulated within a mass range of 92 to 1000 m/z. A resolving power of 400,000 at 300 m/z was achieved. Exported features were assigned to elemental formulae and represented using an H/C vs. O/C van Krevelen diagram, which highlights family compounds, such as carbohydrates (H/C 1.5-2; O/C 0.8-1), fatty acids (H/C 1.9-2.1; O/C 0-0.25), amino acids (H/C 1-2; O/C 0.2-0.8), nucleic acids (H/C 1.1-1.4; O/C 0.3-1), and anthocyanins (H/C 0.5-1; O/C 0.4-0.8) (fig. 1). The metabolite formulae can then be entered into data bases, such as KEGG, Lipidmap, YMDB, Metlin, or an in-house developed plant and wine database, to annotate them and identify corresponding metabolic pathways.

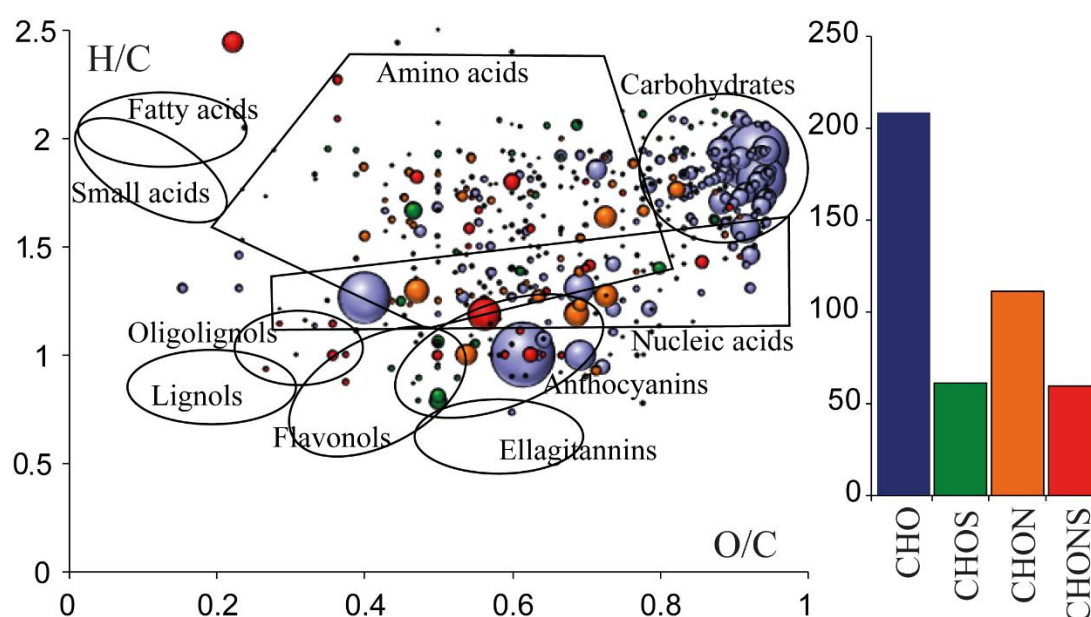


Figure 1: FT-ICR-MS metabolome profiling. (Left) H/C vs. O/C van Krevelen diagram of common masses found in all fermentations (LT, SC, SF+ and SF-) with the region where metabolite families are represented and (right) histograms representing the abundance of metabolites composed with CHO, CHOS, CHON or CHONS atoms.

### *Statistical analysis*

The MS was first calibrated using arginine ion clusters ( $57 \text{ nmol.mL}^{-1}$  in methanol). Next, raw spectra were further internally calibrated using a reference list, including known wine markers and ubiquitous fatty acids, to achieve the best possible mass accuracy and precision among the samples. Raw spectra were post-processed using Compass DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and peaks with a signal-to-noise ratio (S/N) of at least six were exported to mass lists. All exported features were aligned in a matrix containing averaged m/z values (maximum peak alignment window width:  $\pm 1 \text{ ppm}$ ) and corresponding peak intensities of all analyzed samples. Only m/z features of monoisotopic candidates and those with feasible mass defects were retained in the matrix.

All further data processing was performed using Microsoft Excel 2010 and R Statistical Language (version 3.4.1). Only molecular features detected in at least two of the three replicates ( $S/N \geq 6$ ) of one sample group were considered for further data analysis and interpretation. Remaining  $m/z$  values were assigned to their unambiguous molecular formulae as already described.

Principal component analysis (PCA), hierarchical cluster analysis (HCA), and analysis of variance (ANOVA) were performed using Perseus 1.5.1.6 (Max Planck Institute of Biochemistry, Germany). For HCA, the Euclidean distance and average linkage were chosen and for ANOVA, a threshold  $p$ -value of 0.05.

## Results and discussion

### Fermentation kinetics and yeast viability

We carried out sequential fermentations to obtain a better understanding of the interaction between *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans*. Must was first inoculated with *L. thermotolerans* and 24 h later with *S. cerevisiae* to allow the growth of the non-*Saccharomyces* yeast species before the addition of *S. cerevisiae* (Gobbi et al., 2013; Sadoudi, 2014; Balikci et al., 2016). Sequential fermentations were carried out with or without physical contact to study the consequences of cell-cell interactions. Indeed, such a strategy has been used previously to successfully investigate this type of interaction (Nissen and Arneborg, 2003; Nissen et al., 2003; Renault et al., 2013; Englezos et al., 2019).

### Fermentation kinetics

The kinetics of sugar consumption and ethanol production for each fermentation are presented in fig. 2. Pure fermentation with *S. cerevisiae* (SC) resulted in complete alcoholic fermentation in 10 days, reaching 13.3% (v/v) ethanol with no remaining sugars. Pure fermentation with *L. thermotolerans* (LT) was slower, the percentage of ethanol reaching 12.2% (v/v), but fermentation was not complete, even after 21 days, with remaining sugar at a concentration of approximately  $5.7 \text{ g.L}^{-1}$ . Sequential fermentations with (SF+) or without (SF-) physical contact (fig. 2) were both complete after 16 days, with approximately 13.2% (v/v) ethanol and no remaining sugars. These slower kinetics, relative to those with SC, are a reflection of negative interactions. We thus monitored yeast viability to explain this behavior.

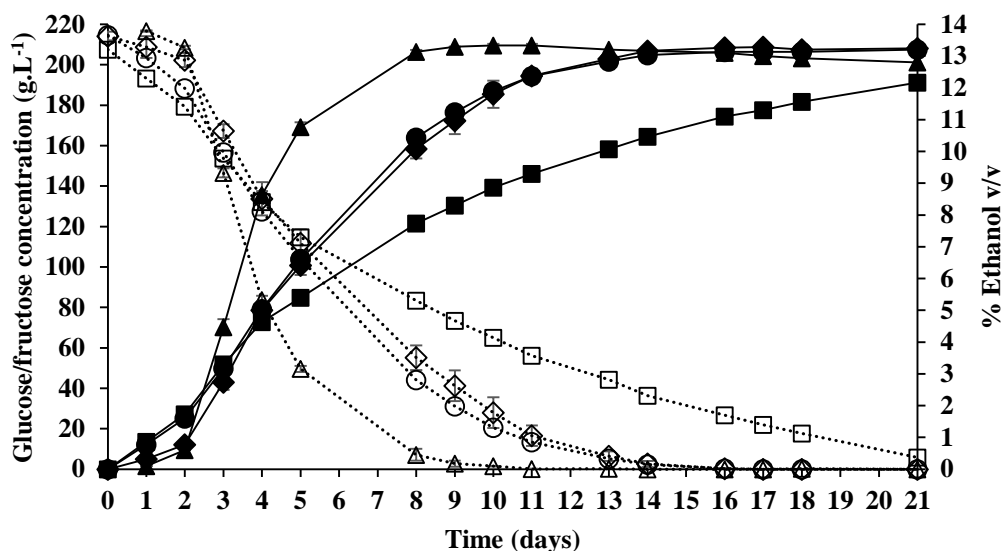


Figure 2: Fermentation kinetics with sugar consumptions (glucose and fructose) and ethanol production by yeasts in pure and sequential fermentations with and without dialysis membrane in white must at 20°C:  $\bullet\blacktriangle\bullet\bullet$  Glucose/fructose and  $-\Delta-$  % Ethanol (v/v) *S. cerevisiae* pure fermentation (SC);  $\bullet\blacksquare\bullet\bullet$  Glucose/fructose and  $-\square-$  % Ethanol (v/v) *L. thermotolerans* pure fermentation (LT);  $\bullet\blacklozenge\bullet\bullet$  Glucose/Fructose and  $-\diamond-$  % Ethanol (v/v) sequential fermentation without contact (SF-);  $\bullet\bullet\circ\bullet\bullet$  Glucose/fructose and  $-\circ-$  % Ethanol (v/v) sequential fermentation with contact (SF+).

### Yeast viability

We used a modified *S. cerevisiae* strain expressing green fluorescent protein (GFP) to separate the *S. cerevisiae* from the non-*Saccharomyces* population, allowing the use of flow cytometry to follow cell viability during pure and sequential fermentations.

Cell viability was determined by PI staining (Delobel et al., 2012) and PI-negative cells were considered to be viable. *L. thermotolerans* cells in LT and both SFs (fig. 3A) showed a maximum viable population of approximately  $1.50 \times 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup> after 24 h of alcoholic fermentation, which remained stable until day 5, with no significant difference between the three conditions (t-test,  $p < 0.05$ ). However, there was a rapid decrease of the viable population in both SFs when the percentage of ethanol reached approximately 10% (v/v), whereas no decrease occurred in LT. This result shows that *S. cerevisiae* had no impact on the growth of *L. thermotolerans* but suggests that *L. thermotolerans* has difficulties in adapting to the faster fermentation kinetics imposed by *S. cerevisiae* in SF, confirming previous results (Nissen et al., 2003; Kapsopoulou et al., 2006; García et al., 2017).

We observed the largest viable population ( $1.42 \times 10^8$  cells.mL<sup>-1</sup>) for *S. cerevisiae* cells in SC (fig. 3B), whereas the lowest was found for the two SFs:  $6.57 \times 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup> for SF- and only  $9.37 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> for SF+, representing a decrease of 54.0 and 93.4% of the viable population, respectively. These results confirm the negative impact of *L. thermotolerans* on *S.*

*cerevisiae* in both SFs, with a lower population of *S. cerevisiae*. This decrease was greater in SF+ than SF-, reflecting a cell-cell contact-dependent mechanism, confirming previous reports (Nissen et al., 2003; Renault et al., 2013; Lopez et al., 2014; Rossouw et al., 2018). However, despite the difference in viable populations between the two SFs, the fermentation kinetics were exactly the same (fig. 2). The lower fermentation activity in SF- could be explained by higher competition for nutrients, since a higher biomass was present than in SF+. Nutrient depletion could explain the reduced fermentation activity, as previously described (Bely et al., 1990; Carrau et al., 2008; Barrajon et al., 2011).

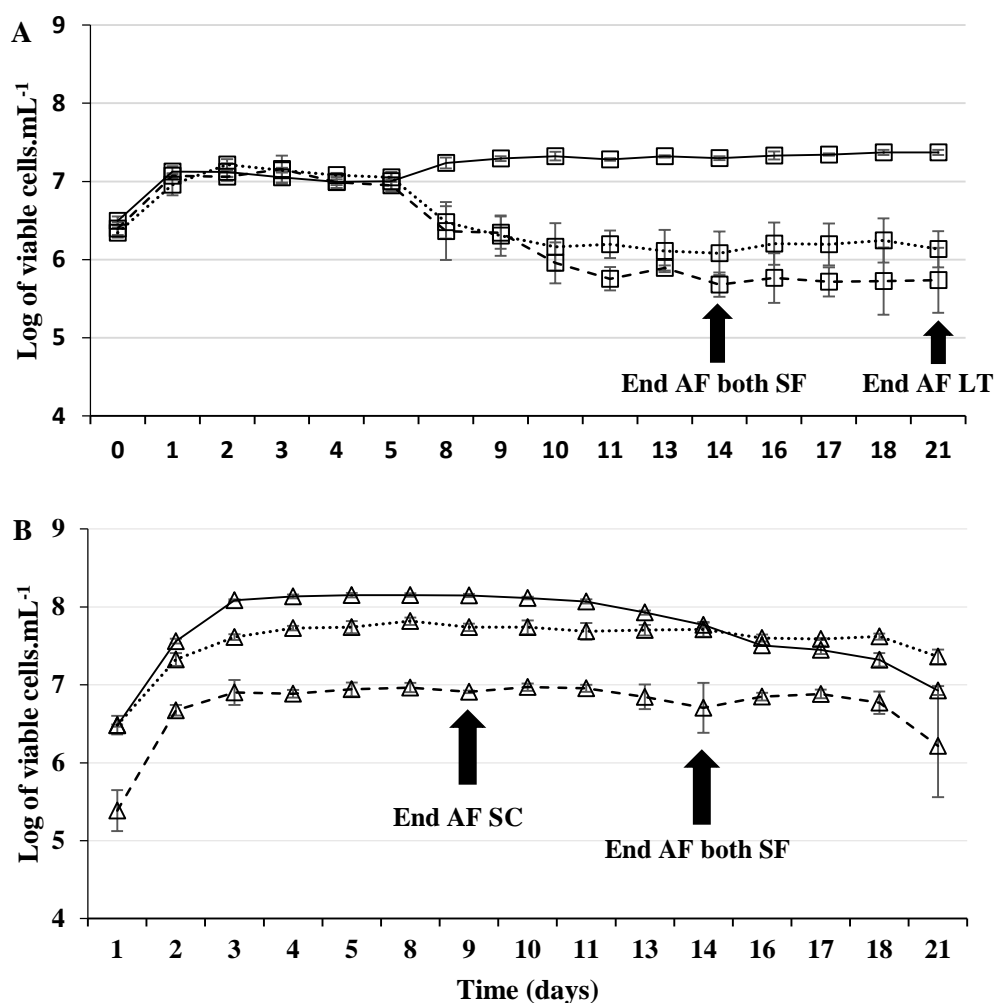


Figure 3: Curves showing the concentration of PI-negative cells (viable cells, log representation) in pure and sequential fermentations in white must at 20°C:  
 (A) □ *L. thermotolerans* pure fermentation (LT); -- □ -- *L. thermotolerans* SF+; ••□•• *L. thermotolerans* SF-.  
 (B) △ *S. cerevisiae* pure fermentation (SC); -- △ -- *S. cerevisiae* SF+; ••△•• *S. cerevisiae* SF-.

### Competition for nutrients

Yeast under fermentation conditions are subjected to very low concentration of dissolved oxygen, which could affect their growth rate because they require it for unsaturated fatty-acid (UFA) and sterol synthesis, in particular ergosterol, both involved in yeast membrane formation

(Salmon et al., 1998; Deytieux et al., 2005). Indeed, under conditions of aerobiosis, yeast are able to synthesize UFA and sterols with a succession of reactions involving oxygen-dependent enzymes (Tehlivets et al., 2007). However, these enzymes are not active in the absence of oxygen. Under such conditions, yeast use fatty acids and sterols present in the medium, *i.e.* fatty acids and phytosterols present in the must in our case. The impact of dissolved oxygen on non-*Saccharomyces/S. cerevisiae* interactions is only poorly documented (Hansen et al., 2001; Englezos et al., 2018). These authors showed that the addition of oxygen to co-fermentations of *S. bacillaris* and *S. cerevisiae* promoted the persistence of *S. bacillaris*. Based on these results, the competition for oxygen could, in part, explain the observed interaction. Thus, we monitored the consumption of dissolved oxygen during both SFs and quantified phytosterols in the must before inoculation with *S. cerevisiae* (24 h of fermentation by *L. thermotolerans* alone) to determine whether *L. thermotolerans* consumes these nutrients before *S. cerevisiae* inoculation. We measured dissolved-oxygen levels 3 h (time 0.125 days) after *L. thermotolerans* inoculation and every day thereafter, before the other analyses, to determine the kinetics of dissolved-oxygen consumption (figure 4). The consumption of dissolved oxygen by *L. thermotolerans* was very rapid, with a drop from 4.1 mg.L<sup>-1</sup> at T0 to 0.21 mg.L<sup>-1</sup> after 3 h and down to 0 mg.L<sup>-1</sup> for all fermentations until day 18, with an increase for SF- by day 21. These results highlight the absence of dissolved oxygen in both SFs. The very low concentration of oxygen present when the fermentation was inoculated with *S. cerevisiae* could explain the lower biomass observed under SF conditions. Indeed, oxygen availability has been shown to affect *S. cerevisiae* biomass production and viability during alcoholic fermentation (Blateyron and Sablayrolles, 2001; Fornairon-Bonnefond and Salmon, 2003). Moreover, it has been recently reported that oxygen availability strongly influences the viability of non-*Saccharomyces* species (Varela et al., 2012; Shekhawat et al., 2017; Englezos et al., 2018). Thus, early consumption of oxygen by *L. thermotolerans* could partially explain the decreased biomass and viability of the yeast during both SFs.

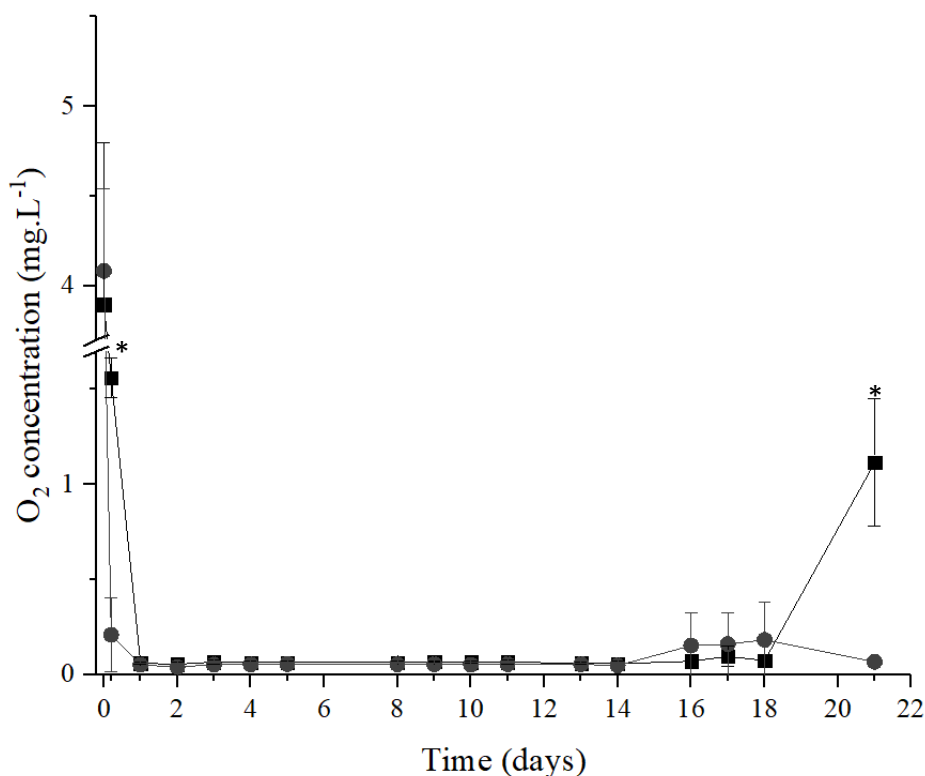


Figure 4: Consumption of dissolve oxygen during alcoholic fermentation of both sequential fermentations with (SF+) or without (SF-) contact: -●- SF+; -■- SF-.

\* significant difference (T-test.  $p$ -value < 0.05) between both fermentations.

We also monitored phytosterol uptake by *L. thermotolerans* during the first 24 h, before inoculation with *S. cerevisiae*, in parallel to oxygen consumption. The major phytosterol present in the must was  $\beta$ -sitosterol (Table 1), as reported in the literature (Luparia et al., 2004; Rollero et al., 2016), at a concentration of approximately 29 mg.L<sup>-1</sup>, with the two other phytosterols present at lower concentrations, approximately 1.9 mg.L<sup>-1</sup> for campesterol and 1.6 mg.L<sup>-1</sup> for stigmasterol. *L. thermotolerans* consumed approximately 68% of the  $\beta$ -sitosterol, 14% of the stigmasterol, and all the campesterol in only 24 h of fermentation. Thus, only a low concentration of the remaining phytosterols were available for *S. cerevisiae* growth under anaerobiosis. Both oxygen and phytosterol uptake by *L. thermotolerans* may explain, in part, the negative observed interaction, which led to a decrease in biomass, viability, and consequently fermentative capacity. Indeed, the stress encountered by *S. cerevisiae* may be explained, in part, by the direct anaerobiosis at the time of inoculation, blocking ergosterol and UFA synthesis, as well as the absence of phytosterols available to replace ergosterol in the membrane, which can affect growth and fermentative activity, as shown by Luparia *et al.* (2004), Deytieux *et al.* (2005) and Salmon, 2006. Thus, a competition for oxygen and phytosterol has been reported as a yeast-yeast interaction in this study. Hansen *et al.* (2001) and Englezos *et al.* (2018) previously showed that low oxygen levels affect non-*Saccharomyces*

species and phytosterol uptake has only been studied in *S. cerevisiae* strains (Luparia et al., 2004; Rollero et al., 2016).

Table 1: Starting concentration of phytosterols (mg.L<sup>-1</sup>) in the must and after 24 h of alcoholic fermentation by *L. thermotolerans* before inoculation with *S. cerevisiae*. nd, non determined.

	Sterol concentration (mg.L <sup>-1</sup> )		
	Must (T0)	T24 h before <i>S. cerevisiae</i> inoculation	% of decrease
<b>ergosterol</b>	nd	nd	nd
<b>campesterol</b>	1.9 ± 0.1	nd	nd
<b>stigmasterol</b>	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.04	14.0 ± 12.0
<b>β-sitosterol</b>	28.8 ± 1.2	9.2 ± 1.4	68.0 ± 3.8

#### Quantifications of YAN and volatile compounds during alcoholic fermentations

##### YAN quantification

The nitrogen content of grape must is a key factor for yeast growth and a sufficient quantity is required to avoid stuck/sluggish fermentation (Wang et al., 2003; Bell and Henschke, 2005; Gobert et al., 2017). An important part of YAN comes from ammonium, which must be in a sufficient amount for the growth of non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae*. Certain amino acids can be used as YAN sources and aromatic amino acids are precursors for volatile compound production, increasing wine complexity (Kemsawasd et al., 2015b; González et al., 2018). Thus, the consumption of YAN sources during the first day of fermentation by *L. thermotolerans* was analyzed to assess the remaining YAN sources at the time of *S. cerevisiae* inoculation (Table 2). There was considerable uptake of the various nitrogen sources by *L. thermotolerans*. Among them, Arg, Asn, Gln, Ile and Ser have been shown to be preferred nitrogen sources for *S. cerevisiae* (Godard et al., 2007; Kemsawasd et al., 2015b), meaning that under our conditions, only non-preferential or intermediate sources were available at the time of *S. cerevisiae* inoculation. Thus, consumption of the preferential nitrogen sources by *L. thermotolerans* (> 79%) could explain, in part, the lower biomass and viability of *S. cerevisiae* under both SF conditions than that of pure fermentation, for which all nitrogen sources are available.

Table 2: Starting concentration of amino acids and ammonium (mg of N.L<sup>-1</sup>) in the must and after the first 24 hours of fermentation with *L. thermotolerans* (LT), as well as the percentage decrease, representing the consumption of each compound. \* indicates aromatic amino acids.

YAN	Concentration (mg N.L <sup>-1</sup> )		% of decrease
	Must (T0)	T24h	
<b>Alanine</b>	22.78 ± 0.44	11.36 ± 3.18	50.2 ± 5.0
<b>Arginine</b>	315.03 ± 2.38	39.08 ± 34.28	87.6 ± 1.5
<b>Asparagine</b>	2.70 ± 0.12	0.05 ± 0.40	98.2 ± 3.2
<b>Aspartic acid</b>	3.99 ± 0.12	0.54 ± 0.52	86.4 ± 0.6
<b>Cysteine</b>	0.47 ± 0.41	0.02 ± 0.19	87.3 ± 18.3
<b>GABA</b>	4.53 ± 0.09	4.41 ± 0.18	2.6 ± 6.8
<b>Glutamic acid</b>	5.71 ± 0.12	1.93 ± 0.94	66.2 ± 3.4
<b>Glutamine</b>	41.35 ± 0.89	3.44 ± 4.01	91.7 ± 1.1
<b>Glycine</b>	1.96 ± 0.11	0.90 ± 0.13	54.0 ± 8.4
<b>Histidine*</b>	13.52 ± 0.37	0.01 ± 1.75	99.9 ± 0.2
<b>Isoleucine</b>	1.62 ± 0.14	0.11 ± 0.25	93.0 ± 3.4
<b>Leucine</b>	2.33 ± 0.03	0.16 ± 0.17	92.9 ± 7.0
<b>Lysine</b>	0.04 ± 0.07	0.04 ± 0.22	/
<b>Methionine</b>	0.96 ± 0.24	0.21 ± 0.12	75.4 ± 20.6
<b>NH4+</b>	242.0 ± 2.0	163.0 ± 18.0	32.6 ± 9.1
<b>Phenylalanine*</b>	10.15 ± 0.06	0.03 ± 0.92	99.7 ± 0.2
<b>Proline</b>	83.86 ± 1.33	83.66 ± 7.13	0.11 ± 13.0
<b>Serine</b>	19.23 ± 0.24	2.76 ± 2.51	85.7 ± 2.7
<b>Threonine</b>	15.81 ± 0.65	0.80 ± 1.55	94.9 ± 1.1
<b>Tyrosine*</b>	3.87 ± 0.01	0.57 ± 0.43	85.2 ± 3.3
<b>Valine</b>	3.83 ± 0.08	0.80 ± 0.44	79.2 ± 3.1

Indeed, there must be a synergic effect between oxygen, phytosterol and YAN uptake by *L. thermotolerans* that negatively affect the growth of *S. cerevisiae*. It is highly likely that the lower biomass of *S. cerevisiae* under SF conditions is triggered by limited nutrient availability (oxygen, phytosterols and nitrogen sources).



Aside from the effect on yeast biomass and yeast viability, oxygen, phytosterol and YAN influence the volatile composition of wine (Hirst and Richter, 2016). Consumption of these nutrient by *L. thermotolerans* could thus affect the volatile composition of wine.

#### Volatile compounds quantification

A volatile compound quantification by HS-SPME-GC/MS for all fermentations was performed to assess the impact of *L. thermotolerans* on SF. This method identified 40 volatile compounds in our fermentations (Table 3). Based on the 40 volatile compounds analyzed, we performed a Principal Component Analysis (PCA). PCA analysis clearly distinguished the three different modalities (fig. 5). Wine produced by SC could be separated from that produced by LT on the basis of higher alcohol content. Wines produced by both yeast species form a distinct group, but there were observable differences between the SF+ and SF- modalities, which reflect the impact of cell-cell contact on volatile compound production. This is the first time that volatile compounds have been analyzed under SF conditions, with or without cell-cell contact, although several other studies of co-fermentation with *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* have been performed, but not with physical separation, as discussed above.

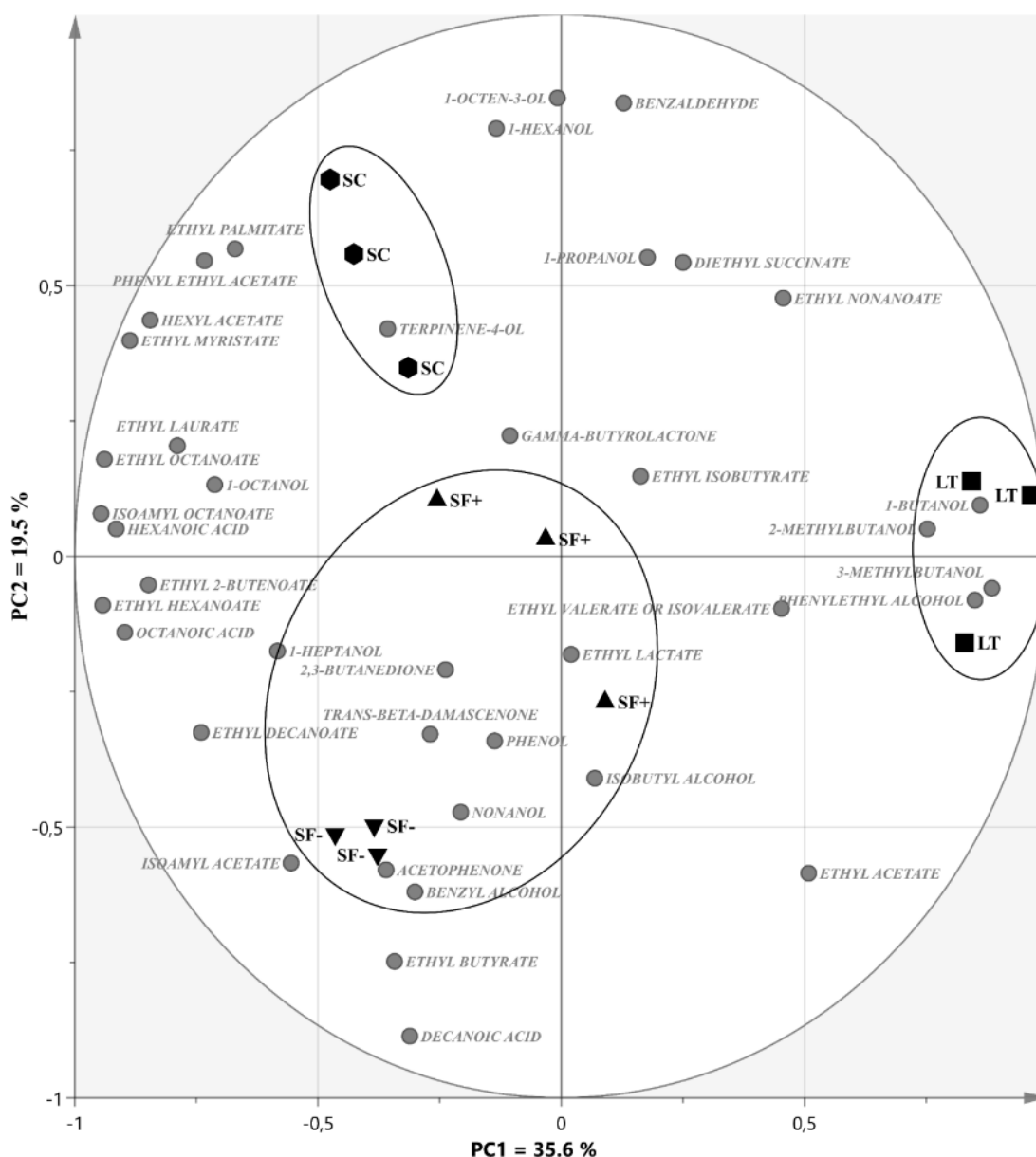


Figure 5: Biplot of the principal component analysis (PC1 vs. PC2) for volatile compounds found in each fermentations. Ellipses represent clusters obtained from HCA.

SF+: sequential fermentation with contact

SF-: sequential fermentation without contact (both compartments)

SC: *S. cerevisiae* pure fermentation

LT: *L. thermotolerans* pure fermentation

A detailed examination of volatile compound composition (table 3) shows that LT resulted in the highest concentration of total alcohols, with approximately  $622.7 \text{ mg.L}^{-1}$  versus  $475.7$ ,  $455.2$ , and  $494.3 \text{ mg.L}^{-1}$  for SC, SF+ and SF-, respectively. Thus, the presence of *S. cerevisiae* limits the production of higher alcohols by *L. thermotolerans*. These results could reflect a decrease in the viability of *L. thermotolerans* after eight days of SF, leading to lower concentrations of higher alcohol concentrations than with LT. In contrast, the total concentration of medium chain fatty acids for LT was approximately  $3.6 \text{ mg.L}^{-1}$ , lower than for

SC (12.2 mg.L<sup>-1</sup>). Each SF condition resulted in a specific concentration of these compounds, 7.03 mg.L<sup>-1</sup> for SF+, representing an intermediate concentration between that of LT and SC, and 14.3 mg.L<sup>-1</sup> for SF-. Our results show that the cell-cell contact modulates the production of medium-chain fatty acid, with an almost 2-fold lower concentration for SF+ than SC. Our results contradict those of previous studies, which did not find any differences in medium-chain fatty acid production between co-fermentation of *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* pure fermentation (Benito et al., 2015, 2016; Balikci et al., 2016). There were no differences in aldehydes, ketones and lactones levels between LT, SC and SF+ but they were slightly lower for SF- than SC and SF+. There were also no significant differences for terpene compounds between conditions. The last compound family analyzed was esters. The total concentration of these compounds in LT was 559 µg.L<sup>-1</sup>, the lowest for all conditions. Indeed, the total concentration was similar for SC and SF-, 1,725.0 and 1,873.1 µg.L<sup>-1</sup>, respectively, whereas SF+ showed an intermediate concentration with about 1,401.8 µg.L<sup>-1</sup>. Globally, the presence of *L. thermotolerans* appears to decrease the concentration of some esters more in SF+ than SF-, which was also observed in the study conducted by Balikci et al. (2016) in a 24 h sequential fermentation. These results demonstrate a negative impact of *L. thermotolerans* on *S. cerevisiae* for the production of most esters, showing an effect of cell-cell contact on ester production, whereas these compounds are desirable in wine because of their sweet, floral or fruity aromas (Beckner Whitener et al., 2015). Studies conducted by Gobbi et al. (2013) and Benito et al. (2015) on volatile compounds in SF with *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* have shown an increase of ethyl lactate, ethyl hexanoate and isoamyl acetate concentrations, with a decrease of those of ethyl octanoate and phenylethyl acetate, as found in our study.

Tableau 3: Concentration of volatile compounds at the end of AF for each fermentation (SC, LT, SF+ and SF-). Values with the same letters a, b, c or d were not significantly different in Tukey's test (95%); nd, not determined. Aroma descriptors inspired by Beckner Whitener et al. (2015).

Volatile compounds ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Aroma descriptor	LT	SC	SF+	SF-
<i>Alcohols</i>					
1-PROPANOL	weak fusel	2636.9 $\pm$ 609.1 <sup>a</sup>	2619.5 $\pm$ 552.5 <sup>a</sup>	2938.3 $\pm$ 680.9 <sup>a</sup>	1989.4 $\pm$ 600.6 <sup>a</sup>
ISOBUTYL ALCOHOL		14957.5 $\pm$ 1546.9 <sup>a</sup>	13593.4 $\pm$ 3444.2 <sup>a</sup>	16923.5 $\pm$ 2000.3 <sup>a</sup>	15962.0 $\pm$ 2956.7 <sup>a</sup>
1-BUTANOL		1595.1 $\pm$ 588.0 <sup>a</sup>	407.4 $\pm$ 357.1 <sup>b</sup>	287.4 $\pm$ 173.0 <sup>b</sup>	422.8 $\pm$ 216.6 <sup>b</sup>
3-METHYLBUTANOL		64147.9 $\pm$ 10420.4 <sup>a</sup>	36481.7 $\pm$ 8337.5 <sup>b</sup>	37475.9 $\pm$ 6178.1 <sup>b</sup>	41503.1 $\pm$ 5689.8 <sup>b</sup>
2-METHYLBUTANOL		351686.0 $\pm$ 27545.4 <sup>a</sup>	289206.6 $\pm$ 41799.3 <sup>b</sup>	272122.5 $\pm$ 27895.6 <sup>b</sup>	295422.7 $\pm$ 30539.1 <sup>b</sup>
1-HEXANOL	green	3555.6 $\pm$ 633.8 <sup>ab</sup>	4412.8 $\pm$ 499.4 <sup>a</sup>	4119.5 $\pm$ 1006.1 <sup>a</sup>	2932.8 $\pm$ 461.5 <sup>b</sup>
1-OCTEN-3-OL	mushroom	46.0 $\pm$ 10.4 <sup>ab</sup>	56.6 $\pm$ 12.7 <sup>a</sup>	41.7 $\pm$ 11.6 <sup>ab</sup>	35.0 $\pm$ 10.7 <sup>b</sup>
1-HEPTANOL	leafy	146.6 $\pm$ 35.3 <sup>b</sup>	493.5 $\pm$ 58.6 <sup>a</sup>	555.9 $\pm$ 284.4 <sup>a</sup>	592.9 $\pm$ 278.2 <sup>a</sup>
1-OCTANOL	waxy	109.0 $\pm$ 26.8 <sup>b</sup>	244.4 $\pm$ 15.4 <sup>a</sup>	99.3 $\pm$ 20.4 <sup>b</sup>	228.9 $\pm$ 43.5 <sup>a</sup>
NONANOL	fruity	227.2 $\pm$ 43.6 <sup>a</sup>	217.5 $\pm$ 46.4 <sup>a</sup>	304.1 $\pm$ 61.7 <sup>a</sup>	295.7 $\pm$ 88.0 <sup>a</sup>
BENZYL ALCOHOL	fruity	1.0 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	0.9 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	1.0 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	7.2 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>
PHENYLETHYL ALCOHOL	rose	183182.9 $\pm$ 18256.1 <sup>a</sup>	127596.2 $\pm$ 9981.1 <sup>b</sup>	119724.4 $\pm$ 17352.4 <sup>b</sup>	134448.6 $\pm$ 8110.8 <sup>b</sup>
PHENOL		395.9 $\pm$ 134.2 <sup>a</sup>	384.8 $\pm$ 220.5 <sup>a</sup>	589.1 $\pm$ 257.1 <sup>a</sup>	486.4 $\pm$ 97.6 <sup>a</sup>
<b>Total</b>		<b>622687.6 <math>\pm</math> 41831.0<sup>a</sup></b>	<b>475715.5 <math>\pm</math> 54330.3<sup>b</sup></b>	<b>455182.5 <math>\pm</math> 48966.9<sup>b</sup></b>	<b>494327.2 <math>\pm</math> 24460.0<sup>b</sup></b>
<i>Medium chain fatty acids</i>					
HEXANOIC ACID	sour	1050.2 $\pm$ 93.1 <sup>c</sup>	4051.7 $\pm$ 217.7 <sup>a</sup>	2109.2 $\pm$ 300.2 <sup>b</sup>	3938.8 $\pm$ 406.4 <sup>a</sup>
OCTANOIC ACID	rancid	1739.9 $\pm$ 188.8 <sup>d</sup>	7605.2 $\pm$ 824.2 <sup>b</sup>	3984.0 $\pm$ 335.5 <sup>c</sup>	8679.0 $\pm$ 573.7 <sup>a</sup>
DECANOIC ACID	unpleasant	785.1 $\pm$ 116.9 <sup>b</sup>	531.2 $\pm$ 73.4 <sup>c</sup>	941.0 $\pm$ 142.3 <sup>b</sup>	1651.6 $\pm$ 207.4 <sup>a</sup>
<b>Total</b>		<b>3575.1 <math>\pm</math> 367.3<sup>d</sup></b>	<b>12188.2 <math>\pm</math> 965.3<sup>b</sup></b>	<b>7034.2 <math>\pm</math> 719.8<sup>c</sup></b>	<b>14269.4 <math>\pm</math> 896.3<sup>a</sup></b>
<i>Aldehydes, ketones and lactones</i>					
BENZALDEHYDE	almond	4012.7 $\pm$ 376.1 <sup>a</sup>	4469.8 $\pm$ 362.2 <sup>a</sup>	4396.9 $\pm$ 635.7 <sup>a</sup>	2850.2 $\pm$ 889.8 <sup>b</sup>
ACETOPHENONE	almond, sweet, floral	103.6 $\pm$ 12.5 <sup>b</sup>	89.0 $\pm$ 13.2 <sup>b</sup>	249.1 $\pm$ 67.6 <sup>ab</sup>	332.1 $\pm$ 188.7 <sup>a</sup>
2,3-BUTANEDIONE		529.8 $\pm$ 326.4 <sup>a</sup>	608.1 $\pm$ 232.7 <sup>a</sup>	568.9 $\pm$ 296.6 <sup>a</sup>	723.1 $\pm$ 247.9 <sup>a</sup>
GAMMA-BUTYROLACTONE		0.3 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.3 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.3 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.3 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
<b>Total</b>		<b>4646.4 <math>\pm</math> 415.5<sup>ab</sup></b>	<b>5167.3 <math>\pm</math> 529.1<sup>a</sup></b>	<b>5215.3 <math>\pm</math> 639.4<sup>a</sup></b>	<b>3905.6 <math>\pm</math> 456.4<sup>b</sup></b>
<i>Terpenes</i>					
TERPINENE-4-OL	spicy, mentol	0.7 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	5.3 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>	0.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.3 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>
TRANS-BETA-DAMASCENONE	rose	0.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	0.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
<b>Total</b>		<b>1.2 <math>\pm</math> 0.6<sup>a</sup></b>	<b>5.8 <math>\pm</math> 6.5<sup>a</sup></b>	<b>1.0 <math>\pm</math> 0.3<sup>a</sup></b>	<b>2.8 <math>\pm</math> 2.2<sup>a</sup></b>
<i>Esters</i>					
ETHYL ACETATE	fruity or ascendent	102.5 $\pm$ 14.3 <sup>a</sup>	35.9 $\pm$ 8.3 <sup>b</sup>	102.0 $\pm$ 10.3 <sup>a</sup>	91.1 $\pm$ 18.1 <sup>a</sup>
ETHYL ISOBUTYRATE		2.0 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	1.7 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	2.3 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	1.7 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
ETHYL BUTYRATE	fruity	1.5 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.6 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>	2.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
ETHYL VALERATE OR ISOVALERATE	fruity	0.2 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.2 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	0.2 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>
ISOAMYL ACETATE	banana	19.0 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>	23.7 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>	52.5 $\pm$ 21.8 <sup>a</sup>	65.2 $\pm$ 8.8 <sup>a</sup>
ETHYL 2-BUTENOATE		nd <sup>b</sup>	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.1 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
ETHYL HEXANOATE	fruity	324.6 $\pm$ 50.3 <sup>c</sup>	996.4 $\pm$ 78.0 <sup>a</sup>	719.6 $\pm$ 84.1 <sup>b</sup>	1126.0 $\pm$ 134.4 <sup>a</sup>
HEXYL ACETATE	banana	1.7 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	26.9 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	13.8 $\pm$ 10.5 <sup>b</sup>	16.2 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>
ETHYL LACTATE		46.6 $\pm$ 7.2 <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>	194.9 $\pm$ 57.1 <sup>a</sup>	46.4 $\pm$ 15.1 <sup>b</sup>
ETHYL OCTANOATE	apricot	45.5 $\pm$ 8.4 <sup>d</sup>	576.8 $\pm$ 58.2 <sup>a</sup>	272.6 $\pm$ 40.4 <sup>c</sup>	479.5 $\pm$ 89.3 <sup>b</sup>
ETHYL NONANOATE		4.0 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	3.5 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>	3.6 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>	2.8 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>
ETHYL DECANOATE	sweet	5.2 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	12.5 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	20.9 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	18.6 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
ISOAMYL OCTANOATE	sweet	0.2 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.3 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.6 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
DIETHYL SUCCINATE	fruity	0.8 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
PHENYL ETHYL ACETATE	floral	2.1 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	34.2 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	8.0 $\pm$ 3.4 <sup>c</sup>	15.1 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>
ETHYL LAURATE		0.8 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	1.4 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>
ETHYL MYRISTATE		1.3 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	5.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	4.0 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	3.6 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>
ETHYL PALMITATE		1.1 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	3.7 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	1.9 $\pm$ 0.6 <sup>bc</sup>
<b>Total</b>		<b>559.0 <math>\pm</math> 78.6<sup>c</sup></b>	<b>1725.0 <math>\pm</math> 125.0<sup>a</sup></b>	<b>1401.8 <math>\pm</math> 218.5<sup>b</sup></b>	<b>1873.1 <math>\pm</math> 167.8<sup>a</sup></b>

Several studies on nitrogen sources and volatile compounds have attempted to elucidate the relation between amino acids and volatile compounds, two important families for yeasts in enological conditions. Indeed, amino acid precursors and volatile compound synthesis are linked by regulation of the Ehrlich pathway, which explains the conversion of some amino acids to aromatic volatile compounds (Hazelwood et al., 2008). Thus, the decrease in phenylethyl

acetate concentrations, which gives wine a floral aroma, under both conditions of SF can be easily explained by the depletion of phenylalanine by *L. thermotolerans* before inoculation with *S. cerevisiae*. However, recent studies conducted by Crépin et al. (2017) and Rollero et al. (2017) show that the link between amino acids and volatile compounds is not so simple, even if the influence of YAN on volatile compound production has been confirmed, although it is not fully understood. Their results show that even if phenylalanine is absent for phenylethyl acetate production, the intermediate phenylethyl alcohol is present at the same concentration in all fermentations, meaning that other metabolic pathways may be involved in phenylethyl acetate production. A similar observation can be done with isoamyl acetate (banana aroma), which increase under both SF conditions, whereas its precursor, leucine, was also depleted by *L. thermotolerans*.

#### Metabolomic analysis with FT-ICR-MS

We analysed the exo-metabolome at the end of alcoholic fermentation for each fermentation to better understand the nature of the interaction between yeast species, since it has been shown previously that this approach can successfully unravel interaction mechanisms (Liu et al., 2016).

FT-ICR-MS analyses of SC, LT, SF+, and SF- were performed at the end of alcoholic fermentation. We performed a PCA that included all fermentation conditions (fig. 6A). PCA showed that SC, LT, and SF- present different exo-metabolomes, with good separation between SF- versus SC, LT, and SF+, according to axis 1 (36.8% of the variability) and a separation between LT versus SF-, SC, and SF+, according to axis 2 (20.8% of the variability) (fig. 6A). Based on PCA, SC and SF+ appear to have a more similar exo-metabolome than that of SC versus LT or SF-. These results show that a must fermented by a non-*Saccharomyces* yeast, here *L. thermotolerans*, has an exo-metabolome distinct from that of the same must fermented by *S. cerevisiae*. Nevertheless, the association of the two yeast species by physical contact (SF+) shows the dominance of *S. cerevisiae* over *L. thermotolerans*, whereas physical separation (SF-) led to the modification of both exo-metabolomes, resulting in a new exo-metabolome different from that of SC or LT. We then analyzed the metabolite composition of each fermentation. A Venn diagram (fig. 6B) highlights the difference in composition between SC, LT, SF+ and SF-. First, there were qualitative differences. For example, only two masses were unique to SC, four to SF+, 28 to SF-, and 24 to LT, whereas 15 masses were unique to SF+ and SC, as well as 91 to SC, SF+ and SF-. Each yeast species clearly produced unique

metabolites in pure fermentation not found in the others, which is highlighted in this study. Moreover, the presence of 28 unique metabolites in SF- show that cell-cell contact modifies the metabolism of *S. cerevisiae* or *L. thermotolerans* as 28 metabolites were unique to SF- and only four to SF+. This diagram also shows that 1,247 masses (66.8% of the total composition) were common to all fermentations, but the concentrations varied, depending on the conditions of fermentation (SC, LT, SF+ and SF-).

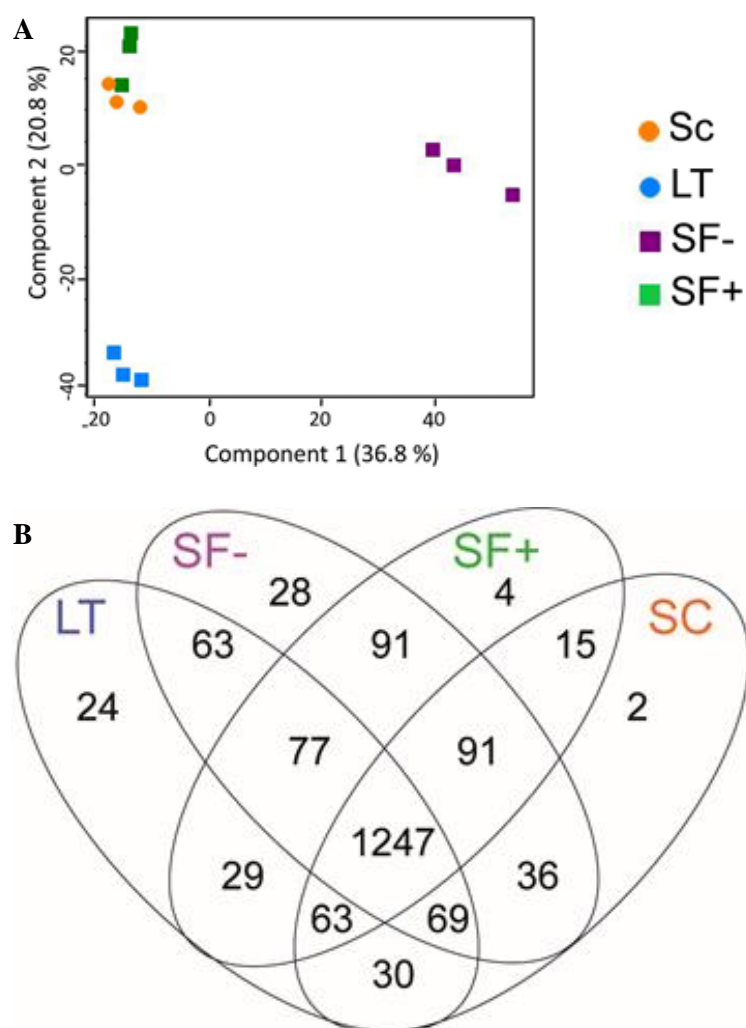


Figure 6: (A) Principal component analysis (PC1 vs. PC2) of metabolite profiles for each fermentation condition. (B) Venn diagram representing metabolites found exclusively in each fermentation, as well as those found in two or more fermentations, with 1,247 metabolites common to all fermentations.

In order to find markers that can discriminate between fermentations, an ANOVA (threshold  $p$ -value < 0.05) has been performed. Specific markers are represented in a hierarchical cluster analysis (HCA) and in Van Krevelen diagrams, highlighting compound families, coupled to histograms of elemental formula composition (fig 7). HCA (fig. 7A) confirmed the four groups found above by PCA, with a greater distance between LT and the other conditions, as well as a very high similarity between SC and SF+ conditions. Thus, for example, SC markers (fig. 7B,

SC) are composed of CHO (blue), CHOS (green), and CHON (orange) in similar quantities (between 10 and 15), but CHNOS (red) compounds are present in only low quantities (approximately 5). These compounds can be associated mostly with carbohydrate, anthocyanin, and amino-acid families. Each fermentation gave a specific profile in which carbohydrate, amino-acid, nucleic-acid, and anthocyanin families were found in all (fig. 7B). However, the intensity of the compounds in each family differed greatly, depending on the fermentation condition, showing that each yeast species has a different metabolism. This metabolism is modified when both yeast species are put together, with a different response, depending on whether the cells are physically separated or not. Moreover, the quantity of compounds was greater for LT and SF-, with approximately 170 for LT (mostly CHO and CHON compounds) and 320 for SF- (mostly CHO and CHON compounds), than for SC (approximately 50) and SF+ (approximately 105), meaning that a higher diversity of compounds was found in LT and SF-. Each yeast clearly has its own impact on SF+ and SF- in terms of chemical composition and these results show that interactions between a non-*Saccharomyces* yeast and *S. cerevisiae* affect not only the volatile compound profile but also the metabolite profile, with specific exo-metabolomes for SC, LT, SF+, and SF- fermentations.

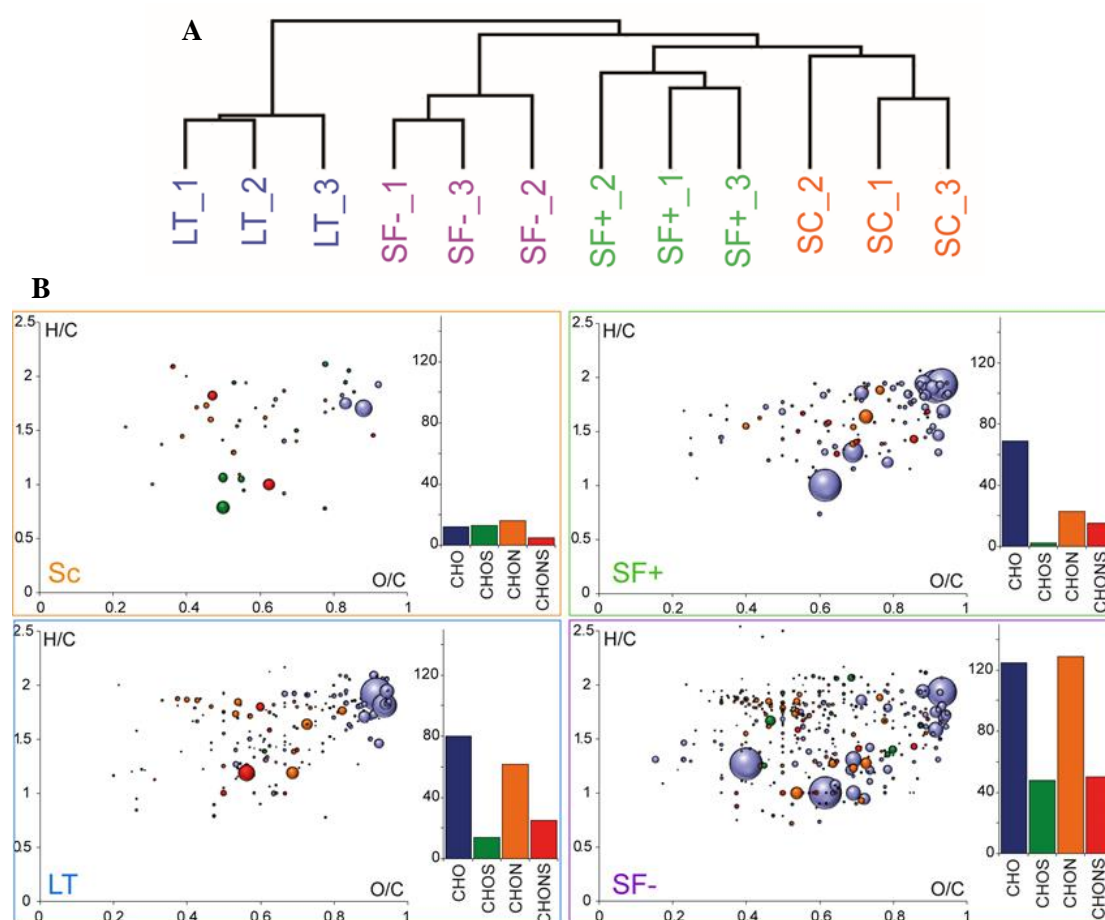


Figure 7: (A) Hierarchical cluster analysis (HCA) obtained after ANOVA (threshold  $p$ -value < 0.05). (B) H/C vs. O/C Van Krevelen diagrams representing masses from the 1,247 common masses with a higher intensity in SC, LT, SF+ or SF- after ANOVA ( $p$ -value < 0.05) with histograms representing their composition and number of compounds with the elemental formula CHO, CHOS, CHON or CHONS. The size of the bubble indicates relative intensities of the corresponding peaks in the spectra.

The analysis was carried out further by making pairwise comparisons for all conditions, *i.e.* LT/SC, LT/SF+, SC/SF+, LT/SF- and SC/SF-, to highlight markers for each pair (fig. 8). First, PCAs were performed for each pair to assess the separation of each fermentation according to axis 1, representing 86.2% of the variability for LT/SC, 89.7% for LT/SF-, 61.6% for SF+/SF-, 46.9% for LT/SF+, and 38.1% for SC/SF+, again highlighting the difference between LT and both SF conditions, as well as the similarity between the SC and SF+ conditions (fig. 8, left). Second, we used ANOVA (threshold *p-value* < 0.05), to find markers for each pair of conditions, represented in H/C vs. O/C van Krevelen diagrams coupled to histograms of elemental formula composition (fig. 8, middle and right). Carbohydrate, amino-acid, nucleic-acid, and anthocyanin families were mostly represented in all comparisons. The next step consisted of annotating these biomarkers and correlating them with the metabolic pathways involved. We sought biomarkers in several databases (KEGG, Lipidmap, YMDB, Metlin and an in-house plant and wine database) and generated a Search and color KEGG visualization (supp. fig. 2) (Kanehisa and Goto, 2000; Kanehisa et al., 2012). Based on the 76 identified metabolic pathways, most LT and SF- biomarkers are involved in carbohydrate, carbon fixation, and amino-acid metabolism. We were unable to identify any biomarkers for SC and only two for SF+, which are involved in carbohydrate and nucleotide metabolism (supp. fig. 2). This highlights the complex metabolite composition of wine, which is still poorly understood, as reported previously by studies using FT-ICR-MS on wine (Roullier-Gall et al., 2014a, 204b; Roullier-Gall et al., 2015).

These results show that metabolites produced by yeast under our different conditions result mainly from sugar and nitrogen source metabolism (also shown in supp. fig. 3), which represents 20 of the 76 identified metabolic pathways. This is not surprising because of the lack of these nutrients at the end of alcoholic fermentation.



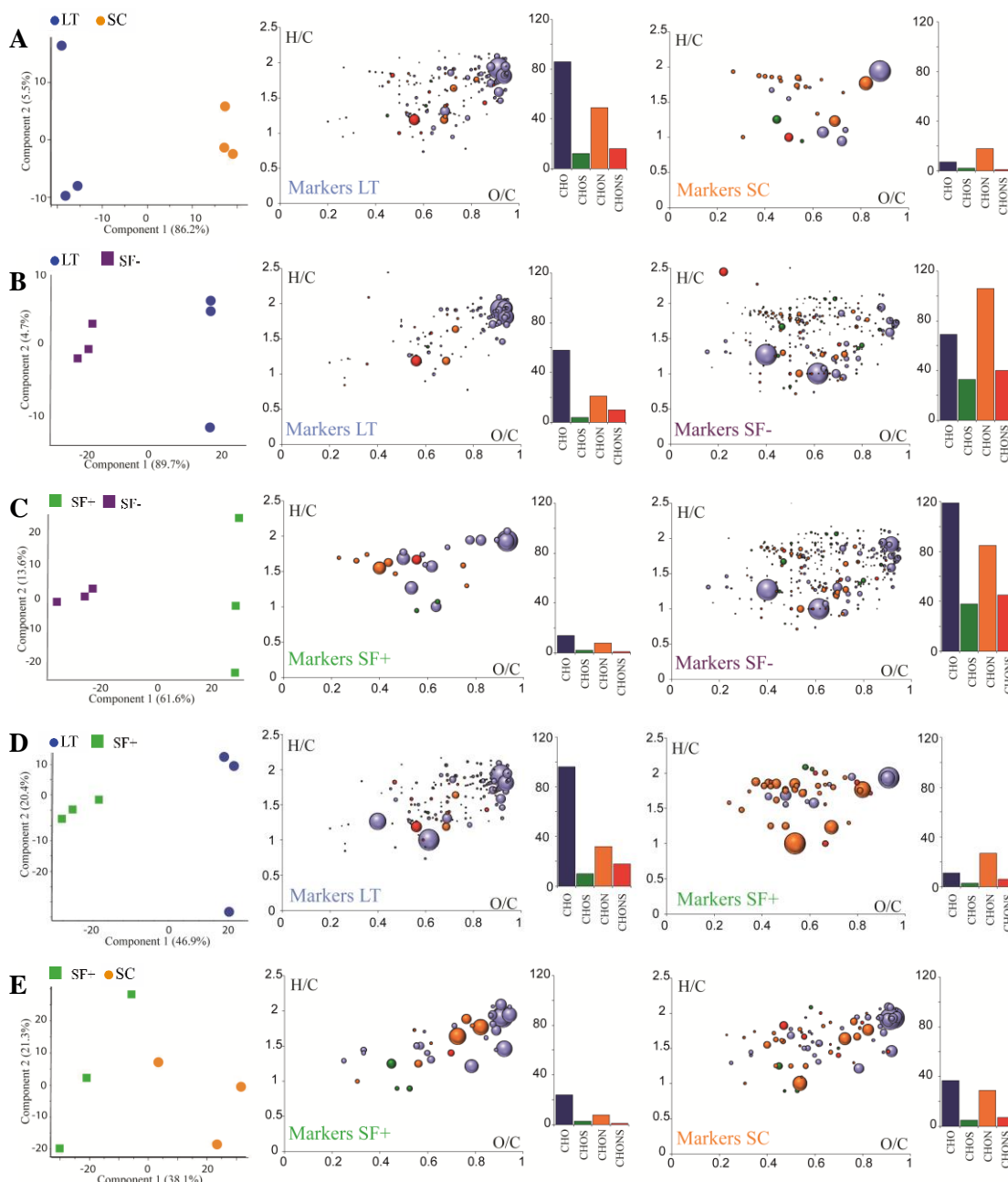


Figure 8: (A, B, C, D and E, left) Principal component analysis (PC1 vs. PC2) of both fermentations for each pair of conditions and (A, B, C, D and E, middle and right) H/C vs. O/C Van Krevelen diagrams representing specific metabolites found in both fermentations of each pair, described as markers coupled to histograms of elemental formula composition. The size of the bubble indicates the relative intensities of the corresponding peaks in the spectra.

These results provide new insights for the further study of interactions between non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* by comparing specific exo-metabolomes (composed of specific markers) of each fermentation, which may reflect the impact of interactions on metabolite production.

Thus, the biomarkers found in our fermentations may be useful given the high intensity of metabolites specific for fermentations performed with *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae*, and SF of both species, with or without cell-cell contact.

## Conclusion

Here, we aimed to investigate the interactions that occur between *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* during alcoholic fermentation of grape must. The results obtained from all analyses performed in this study highlight a negative interaction between the two species to the detriment of *S. cerevisiae*, due to a cell-cell contact mechanism (SF+ fermentation) and the consumption of essential nutrients by *L. thermotolerans* during both SF conditions. However, *L. thermotolerans* was also negatively affected by the presence of *S. cerevisiae* under both SF conditions, even if the quantification of volatile compounds showed that *L. thermotolerans* is able to modulate aroma complexity without differences between the two SF conditions. Moreover, this study provides a comparison of the exo-metabolomes of *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* pure fermentations, as well as SF with both species, with or without cell-cell contact. This comparison showed that interactions also affect metabolite production by *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* during alcoholic fermentation in a different manner as a function of the condition.

In conclusion, this study provides new insights concerning the interaction of *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* during the alcoholic fermentation of grape must. However, further study of the cell-cell contact mechanism and further identification of the metabolites needs to be carried out to better understand the interactions between these two yeast species.

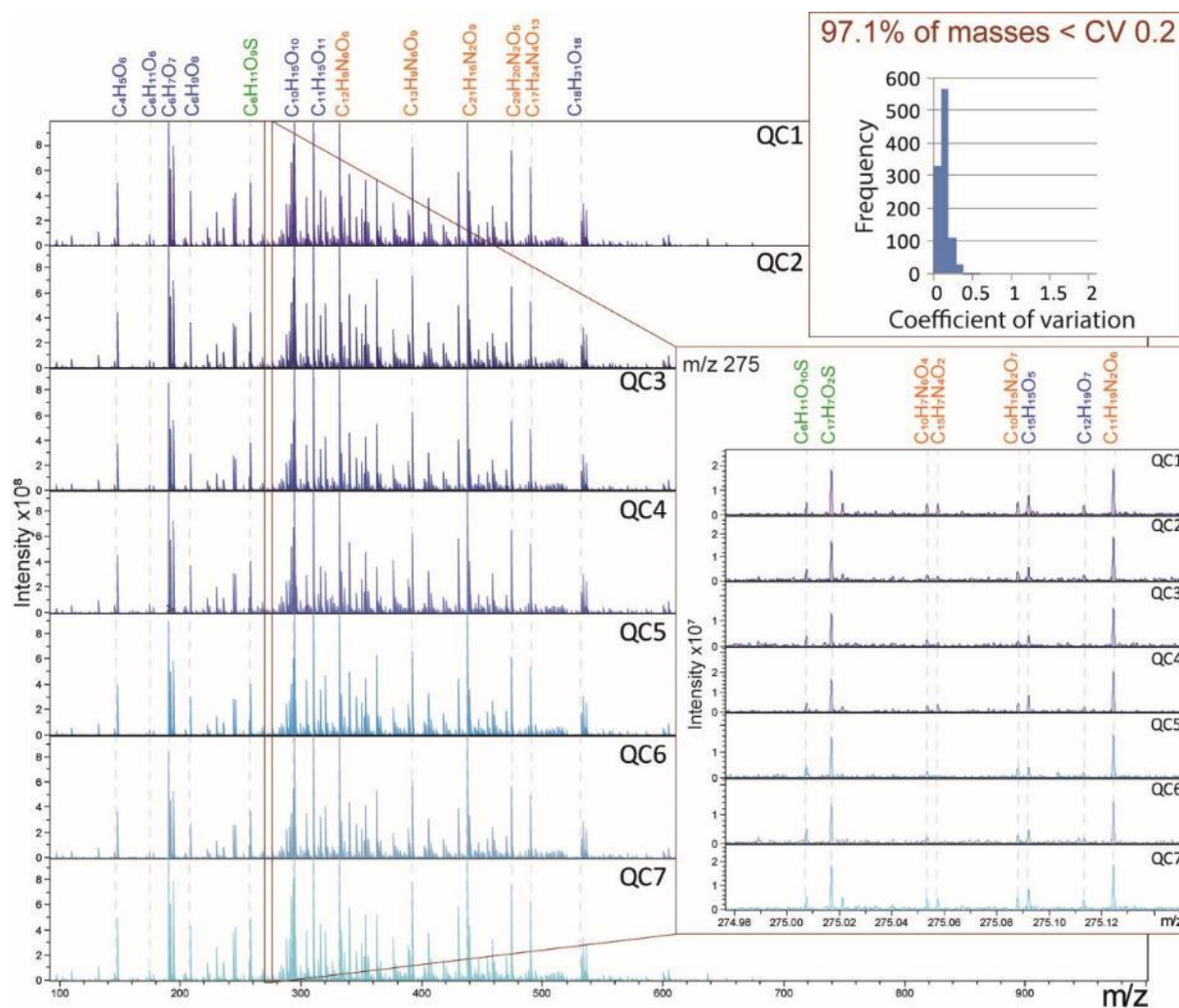
## Acknowledgments

We thank the other members of the VALMiS laboratory for their assistance, in particular Antoine Gobert for amino acid quantification and the other PhD students for their help and advice.

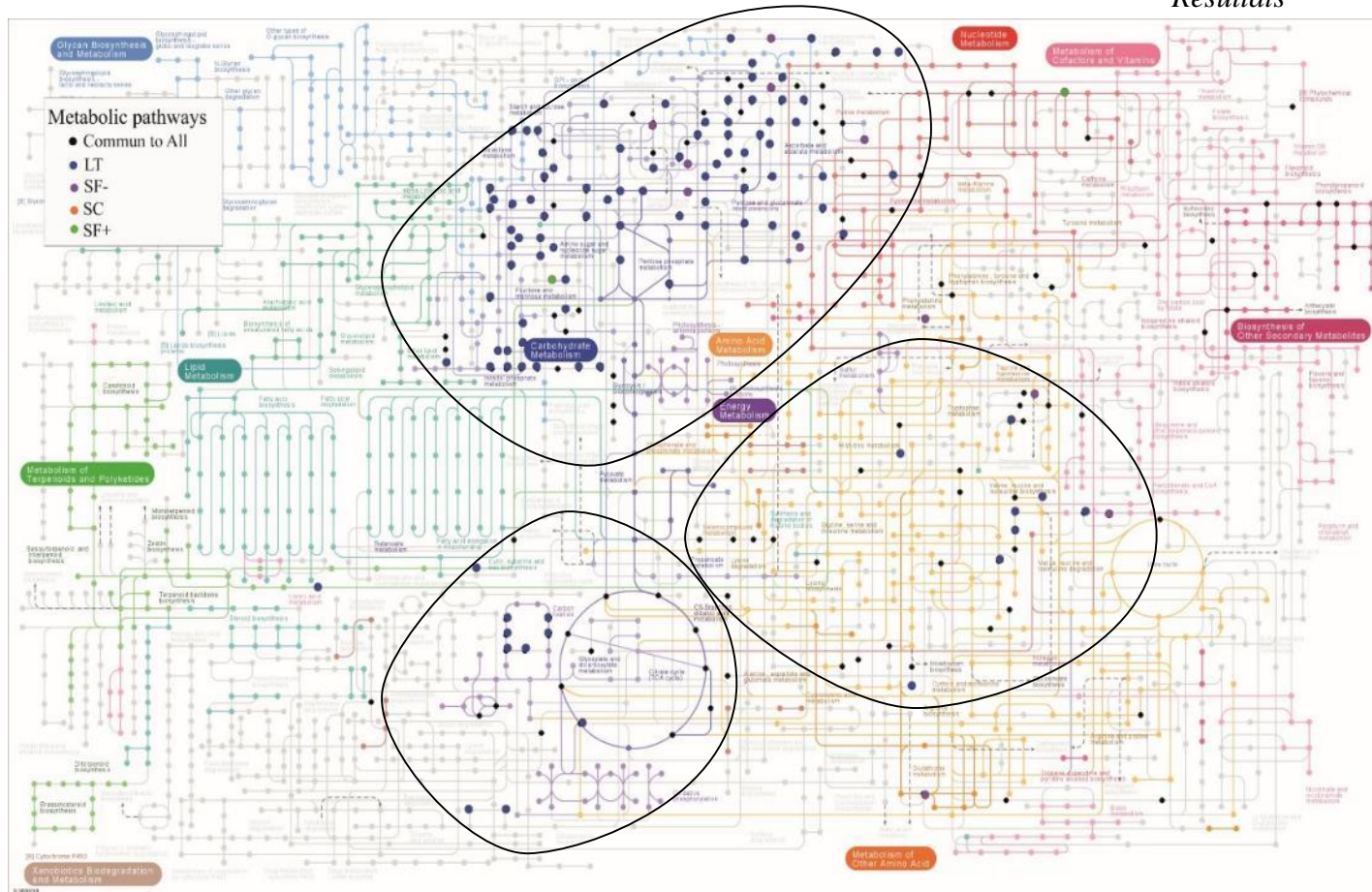
## Funding

This work was supported by the Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation and the Fond Européen De Développement Régional (FEDER) through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 programs.

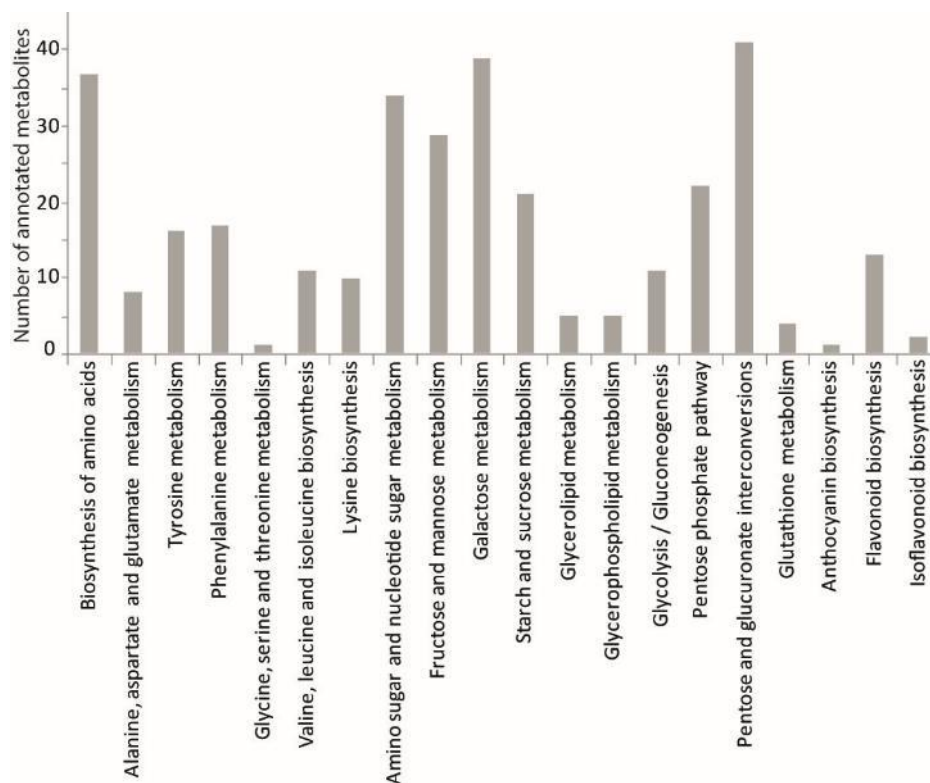
Supplementary files



Supplementary figure 1: Examples of Quality Control (QC) spectra obtained with FT-ICR-MS



Supplementary figure 2: Kegg representation showing an overview of metabolic pathway. Metabolites that were identified in Databases are placed in the involved metabolic pathway, with the legend at the top-left. Principal areas of the metabolic pathways are encircled.



Supplementary figure 3: Histograms showing the 20 involved (out of 76) metabolic pathways, with the number of metabolites identified in each pathway.

Supplementary table 1: Gradient applied for nitrogen sources separation by HPLC

Time (min)	Migration buffer (%)	Acetonitrile (%)	Water (%)
0	100	0	0
1	100	0	0
1,5	99	1	0
16,5	97	3	0
25,5	94	6	0
35,5	86	14	0
51,5	86	14	0
52	0	60	40
55	0	60	40
55,5	100	0	0
66,5	100	0	0

## References

- Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., Gírio, F., 2009. *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 965–972. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2409-6>
- Alexandre, H., Charpentier, C., 1998. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 20–27.
- Balikci, E.K., Tanguler, H., Jolly, N.P., Erten, H., 2016. Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. *Yeast* 33, 313–321. <https://doi.org/10.1002/yea.3166>
- Barbosa, C., Mendes-Faia, A., Lage, P., Mira, N.P., Mendes-Ferreira, A., 2015. Genomic expression program of *Saccharomyces cerevisiae* along a mixed-culture wine fermentation with *Hanseniaspora guilliermondii*. *Microb. Cell Factories* 14. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0318-1>
- Barrajón, N., Arévalo-Villena, M., Úbeda, J., Briones, A., 2011. Enological properties in wild and commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts: relationship with competition during alcoholic fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 2703–2710. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0744-0>
- Beckner Whitener, M.E., Carlin, S., Jacobson, D., Weighill, D., Divol, B., Conterno, L., Du Toit, M., Vrhovsek, U., 2015. Early fermentation volatile metabolite profile of non-*Saccharomyces* yeasts in red and white grape must: A targeted approach. *LWT - Food Sci. Technol.* 64, 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.018>
- Bell, S.-J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 242–295.
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., Barre, P., 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 70, 246–252. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90057-4)
- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., Benito, S., 2016. Quality and Composition of Airén Wines Fermented by Sequential Inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* 54, 135–144. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.02.16.4220>
- Benito, S., 2018. The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0>
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., Fritsch, S., Röcker, J., Rauhut, D., 2015. Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* 241, 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2497-8>
- Blateyron, L., Sablayrolles, J.M., 2001. Stuck and Slow Fermentations in Enology: Statistical Study of Causes and Effectiveness of Combined Additions of Oxygen and Diammonium Phosphate 6.
- Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M.G., Caldeira, J., Albergaria, H., 2014. Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 843–853. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5411-y>

- Burphan, T., Tatip, S., Limcharoensuk, T., Kangboonruang, K., Boonchird, C., Auesukaree, C., 2018. Enhancement of ethanol production in very high gravity fermentation by reducing fermentation-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* 8, 13069. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31558-4>
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., Madeo, F., 2010. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ.* 17, 763–773. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.219>
- Carrau, F.M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P.A., Dellacassa, E., 2008. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res.* 8, 1196–1207. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x>
- Ciani, M., 1997. Role, enological properties and potential biotechnological use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Recent Res. Devel. in Microbiology* 1, 317-331
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., Romano, P., 2016. Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00555>
- Comas-Riu, J., Rius, N., 2009. Flow cytometry applications in the food industry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 999–1011. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0608-x>
- Crépin, L., Truong, N.M., Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2017. Management of multiple nitrogen sources during wine fermentation by *S. cerevisiae*. *Appl. Env. Microbiol.* AEM.02617-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02617-16>
- Delobel, P., Pradal, M., Blondin, B., Tesniere, C., 2012. A ‘fragile cell’ sub-population revealed during cytometric assessment of *Saccharomyces cerevisiae* viability in lipid-limited alcoholic fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 338–344. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03301.x>
- Deytieux, C., Mussard, L., Biron, M.-J., Salmon, J.-M., 2005. Fine measurement of ergosterol requirements for growth of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 266–271. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1872-3>
- Díaz, M., Herrero, M., García, L.A., Quirós, C., 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem. Eng. J.*, Invited Review Issue 2010 48, 385–407. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.013>
- Englezos, V., Cravero, F., Torchio, F., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Lambri, M., Gerbi, V., Rolle, L., Cocolin, L., 2018. Oxygen availability and strain combination modulate yeast growth dynamics in mixed culture fermentations of grape must with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 69, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.007>
- Englezos, V., Rantsiou, K., Giacosa, S., Río Segade, S., Rolle, L., Cocolin, L., 2019. Cell-to-cell contact mechanism modulates *Starmerella bacillaris* death in mixed culture fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 289, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.009>
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramon, D., Querol, A., 1998. The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *Int. Microbiol.* 1, 143–148.
- Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8, 979–995. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>
- Fornairon-Bonnefond, C., Salmon, J.-M., 2003. Impact of Oxygen Consumption by Yeast Lees on the Autolysis Phenomenon during Simulation of Wine Aging on Lees. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2584–2590. <https://doi.org/10.1021/jf0259819>
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Arroyo, T., 2016. Non-*Saccharomyces* Yeasts: Biotechnological Role for Wine Production, in: Morata, A., Loira, I. (Eds.), *Grape and Wine Biotechnology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64957>
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Crespo, J., Cabellos, J.M., Arroyo, T., 2017. Yeast Monitoring of Wine Mixed or Sequential Fermentations Made by Native Strains from D.O. “Vinos de Madrid” Using Real Time Quantitative PCR. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02520>
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* 33, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
- Gobert, A., Tournet-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Alexandre, H., 2017. Non-*Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences: Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02175>
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., Helden, J. van, André, B., 2007. Effect of 21 Different Nitrogen Sources on Global Gene Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3065–3086. <https://doi.org/10.1128/MCB.01084-06>
- González, B., Vázquez, J., Morcillo-Parra, M.Á., Mas, A., Torija, M.J., Beltran, G., 2018. The production of aromatic alcohols in non-*Saccharomyces* wine yeast is modulated by nutrient availability. *Food Microbiol.* 74, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.003>
- Hansen, E.H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., Arneborg, N., 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 541–547. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01426.x>

- Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., Maris, A.J.A. van, Pronk, J.T., Dickinson, J.R., 2008. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2259–2266. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>
- Hirst, M.B., Richter, C.L., 2016. Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in Beverage Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 67, 361–370. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.15098>
- Jolly, J., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., others, 2006. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 27, 15.
- Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S., 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 14, 215–237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>
- Kanehisa, M., Goto, S., 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., Tanabe, M., 2012. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* 40, D109–D114. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr988>
- Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., Spyropoulos, H., 2005. Growth and Fermentation Characteristics of a Strain of the Wine Yeast *Kluyveromyces thermotolerans* Isolated in Greece. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 1599–1602. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-8220-3>
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., Nerantzis, E., 2006. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 735–739. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9283-5>
- Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., Arneborg, N., 2015. Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 10191–10207. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6835-3>
- Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D., Mannazzu, I., 2008. ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1780, 892–898. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.008>
- Liu, Y., Forcisi, S., Harir, M., Deleris-Bou, M., Krieger-Weber, S., Lucio, M., Longin, C., Degueurce, C., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., 2016. New molecular evidence of wine yeast-bacteria interaction unraveled by non-targeted exometabolomic profiling. *Metabolomics* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1001-1>
- Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., 2015. Wine microbiome, a dynamic world of microbial interactions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 0, 00–00. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.983591>
- Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., Alexandre, H., 2017. Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiol.* 62, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.023>
- Lopez, C.L.F., Beaufort, S., Brandam, C., Taillandier, P., 2014. Interactions between *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in tequila must type medium fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 2223–2229. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1643-y>
- Luparia, V., Soubeyrand, V., Berges, T., Julien, A., Salmon, J.-M., 2004. Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 25–32. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1549-3>
- Marsit, S., Mena, A., Bigey, F., Sauvage, F.-X., Couloux, A., Guy, J., Legras, J.-L., Barrio, E., Dequin, S., Galeote, V., 2015. Evolutionary Advantage Conferred by an Eukaryote-to-Eukaryote Gene Transfer Event in Wine Yeasts. *Mol. Biol. Evol.* 32, 1695–1707. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv057>
- Mendes-Ferreira, A., Sampaio-Marques, B., Barbosa, C., Rodrigues, F., Costa, V., Mendes-Faia, A., Ludovico, P., Leão, C., 2010. Accumulation of Non-Superoxide Anion Reactive Oxygen Species Mediates Nitrogen-Limited Alcoholic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7918–7924. <https://doi.org/10.1128/AEM.01535-10>
- Mora, J., Barbas, J.I., Mulet, A., 1990. Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 156–159.
- Moradas-Ferreira, P., Costa, V., 2013. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Rep.*
- Nissen, P., Arneborg, N., 2003. Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 180, 257–263. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0585-9>
- Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell–cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20, 331–341. <https://doi.org/10.1002/yea.965>
- Perrone, G.G., Tan, S.-X., Dawes, I.W., 2008. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Apoptosis in yeast* 1783, 1354–1368. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.023>

- Renault, P.E., Albertin, W., Bely, M., 2013. An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4105–4119. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4660-5>
- Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, F., Manzanares, P., 2001. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 283–289. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00552-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00552-9)
- Rollero, S., Mouret, J.-R., Bloem, A., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., Camarasa, C., 2017. Quantitative <sup>13</sup>C-isotope labelling-based analysis to elucidate the influence of environmental parameters on the production of fermentative aromas during wine fermentation. *Microb. Biotechnol.* 10, 1649–1662. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12749>
- Rollero, S., Mouret, J.-R., Sanchez, I., Camarasa, C., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., 2016. Key role of lipid management in nitrogen and aroma metabolism in an evolved wine yeast strain. *Microb. Cell Factories* 15. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0434-6>
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., 1992. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 126–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01698.x>
- Rossouw, D., Meiring, S.P., Bauer, F.F., 2018. Modifying *Saccharomyces cerevisiae* Adhesion Properties Regulates Yeast Ecosystem Dynamics. *mSphere* 3, e00383-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00383-18>
- Roullier-Gall, Chloé, Boutegrabet, L., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., 2014. A grape and wine chemodiversity comparison of different appellations in Burgundy: Vintage vs terroir effects. *Food Chem.* 152, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.056>
- Roullier-Gall, Chloé, Witting, M., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., 2014. High precision mass measurements for wine metabolomics. *Front. Chem.* 2. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00102>
- Roullier-Gall, C., Witting, M., Tziotis, D., Ruf, A., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., 2015. Integrating analytical resolutions in non-targeted wine metabolomics. *Tetrahedron* 71, 2983–2990. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.02.054>
- Sablayrolles, J.-M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.-L., Barre, P., 1996. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 377–381. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89154-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89154-9)
- Sadoudi, M., 2014. Intérêts biotechnologiques des levures indigènes non *Saccharomyces*. Thèse de doctorat en microbiologie. <http://www.theses.fr/s81726>.
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H., 2012. Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol.* 32, 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>
- Salmon, J.-M., 2006. Interactions between yeast, oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations: Practical implications. *LWT - Food Sci. Technol., European Symposium on Apple Processing* 39, 959–965. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.11.005>
- Salmon, J.-M., Fornairon, C., Barre, P., 1998. Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 154–163. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80054-8](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80054-8)
- Shekhawat, K., Bauer, F.F., Setati, M.E., 2017. Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2479–2491. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8001-y>
- Strauss, M. I. a., Jolly, N. p., Lambrechts, M. g., Van Rensburg, P., 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 91, 182–190. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x>
- Taillandier, P., Ramon Portugal, F., Fuster, A., Strehaiano, P., 2007. Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiol.* 24, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.002>
- Tehlivets, O., Scheuringer, K., Kohlwein, S.D., 2007. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids, Regulation of Lipid Metabolism in Yeast* 1771, 255–270. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.004>
- Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 345–352. <https://doi.org/10.1023/A:1012027718701>
- Valera, M.J., Morcillo-Parra, M.Á., Zagórska, I., Mas, A., Beltran, G., Torija, M.J., 2019. Effects of melatonin and tryptophol addition on fermentations carried out by *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast species under different nitrogen conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 289, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.013>



- Varela, C., Torrea, D., Schmidt, S.A., Ancin-Azpilicueta, C., Henschke, P.A., 2012. Effect of oxygen and lipid supplementation on the volatile composition of chemically defined medium and Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem.* 135, 2863–2871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.127>
- Wang, C., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., 2016. The Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and Non-*Saccharomyces* Yeast during Alcoholic Fermentation is Species and Strain Specific. *Food Microbiol.* 7, 502. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00502>
- Wang, X.D., Bohlscheid, J.C., Edwards, C.G., 2003. Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *J. Appl. Microbiol.* 94, 349–359.
- Zhang, B., Luan, Y., Duan, C., Yan, G., 2018. Use of *Torulaspora delbrueckii* co-fermentation with two *Saccharomyces cerevisiae* strains with different aromatic characteristic to improve the diversity of red wine aroma profile. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00606>
- Zupan, J., Avbelj, M., Butinar, B., Kosel, J., Šergan, M., Raspor, P., 2013. Monitoring of Quorum-Sensing Molecules during Minifermentation Studies in Wine Yeast. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2496–2505. <https://doi.org/10.1021/jf3051363>

## Discussion générale

L'objectif de cette thèse était d'étudier les interactions entre *S. cerevisiae* et des levures non-*Saccharomyces* au cours de la fermentation alcoolique. Pour y parvenir, nous avons mis au point un protocole de cytométrie en flux qui a été appliqué sur deux couples de levures *S. cerevisiae* / non-*Saccharomyces*. Par la suite, des analyses multiples ont été réalisées sur des fermentations pures et séquentielles avec le couple *S. cerevisiae* GFP / *L. thermotolerans* afin de mettre en évidence les interactions entre ces levures en condition œnologique.

### Discrimination des populations et marquages fluorescents par cytométrie en flux

La mise en place d'un protocole de cytométrie en flux pour la discrimination et le suivi physiologique par marquage fluorescents des levures a été envisagée. Un panel de fluorochromes a été testé pour couvrir différents paramètres physiologiques comme la viabilité, le stress oxydatif, l'accumulation de lipides intracellulaires, le pH intracellulaire ou encore l'apoptose. Seulement 4 fluorochromes ont été validés pour une utilisation sur les levures *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces* au cours de fermentations alcooliques, puis validés par microscopie confocale. Ce protocole a permis d'avoir une nouvelle approche pour l'étude des interactions entre ces deux espèces de levure. Les résultats obtenus ont mis en évidence une perte de viabilité des deux levures non-*Saccharomyces* en fin de fermentation alcoolique en présence de *S. cerevisiae* uniquement, phénomènes observés dans des études sur des fermentations séquentielles avec ces deux mêmes espèces (Balikci et al., 2016; Benito et al., 2015; Englezos et al., 2015, 2019; Nissen et al., 2003), confirmant la présence d'interactions entre les deux espèces, non encore vraiment expliquées. En revanche, nos résultats rapportent pour la première fois un effet sur les deux souches de *S. cerevisiae* utilisées, avec une diminution importante de la biomasse en fermentation séquentielle par rapport à la fermentation pure, surtout en présence de *L. thermotolerans*. Cela se traduit par une cinétique fermentaire plus longue de 5 jours avec le couple *S. cerevisiae* 59A-GFP/*L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20 comparé à la fermentation pure de *S. cerevisiae*. De plus, une accumulation de granules lipidiques a été observée chez *S. cerevisiae* 59A-GFP dans la fermentation séquentielle, montrant que la physiologie des cellules est modifiée par la présence de *L. thermotolerans*. Au contraire, aucunes modifications au niveau des granules lipidiques et des ROS liées à la présence de *S. cerevisiae* n'ont été détectées chez les deux espèces de non-*Saccharomyces*.

Cette première étude a ainsi permis d'identifier pour la première fois une interaction négative du point de vue de *S. cerevisiae* en présence de deux espèces de non-*Saccharomyces* et un protocole novateur par cytométrie en flux a permis d'étudier au niveau physiologique les

changements au sein des cellules. Il est ainsi apparu évident que d'autres analyses sont nécessaires pour expliquer les interactions observées, c'est pourquoi un focus sur le couple *S. cerevisiae* 59A-GFP/*L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20 a été fait pour la suite de la thèse.

Cependant, le marquage au cFDA pour la viabilité de la souche GFP de *S. cerevisiae* n'étant pas approprié, un autre marquage à l'Iodure de Propidium (IP) a été testé en condition fermentaire. La solution apportée par l'IP a permis d'avoir une quantification indirecte de la viabilité des cellules (marquage uniquement des cellules ayant une membrane altérée) et l'émission de fluorescence dans le rouge de ce marqueur n'interfère pas avec la fluorescence de la GFP. L'IP a donc remplacé le cFDA comme marqueur de viabilité pour la suite de la thèse.

### **Etude du contact cellule-cellule entre *S. cerevisiae* et *L. thermotolerans* au cours de la fermentation alcoolique**

Les fermentations séquentielles réalisées avec le couple *S. cerevisiae* 59A-GFP/*L. thermotolerans* BBMCZ7-FA20 ont ici aussi révélé une diminution de la biomasse de *S. cerevisiae* comparée à la fermentation pure, diminution plus forte dans la condition avec contact entre les cellules. En découle alors une cinétique fermentaire plus longue de 5 jours pour les deux fermentations séquentielles en comparaison de la fermentation pure de *S. cerevisiae*. Ainsi, malgré une biomasse bien inférieure, la fermentation séquentielle avec contact n'a pas pris de retard par rapport à la fermentation séquentielle sans contact, démontrant une activité fermentaire plus faible des cellules dans cette dernière. Des analyses plus poussées ont permis de mettre en évidence pour la première fois une consommation importante par *L. thermotolerans* de certains nutriments essentiels à la croissance des levures, à savoir les phytostérols, l'azote assimilable et l'oxygène dissout contenus dans le moût. Il apparaît évident que cette consommation précoce par *L. thermotolerans* entraîne des effets négatifs sur *S. cerevisiae*, expliquant la diminution de la biomasse dans les fermentations séquentielles. La différence observée entre les deux fermentations séquentielles montre bien l'impact du contact entre les cellules et de la compétition pour les nutriments sur la croissance de *S. cerevisiae*, traduisant un fort effet négatif de *L. thermotolerans*. De plus, les effets du contact cellule-cellule impact aussi le profil des composés volatils présents en fin de fermentation avec une diminution de la production d'esters comparée à la fermentation séquentielle sans contact. Ce résultat diffère de ceux retrouvés dans des études sur ce même couple (Benito et al., 2015; Gobbi et al., 2013), alors qu'il est similaire dans l'étude de Balikci et al. (2016), démontrant bien l'effet souche pour cette analyse. L'analyse de l'exo-metabolome par FT-ICR-MS de chaque

fermentation a permis de mettre en évidence pour la première fois des profils de métabolites différents pour chaque condition, avec un effet évident du contact cellule-cellule qui entraîne un profil différent de la condition sans contact. Cette analyse a aussi permis d'extraire des biomarqueurs potentiels dans chaque condition, démontrant l'impact de chaque espèce de levure sur les fermentations séquentielles d'un point de vue métabolome. De plus, les voies métaboliques affectées lors de ces fermentations ont été mises en évidence, avec particulièrement les métabolismes des sucres, de l'azote ou encore des acides nucléiques qui semblent cohérents avec l'état de carence que subissent les cellules en fin de fermentation.

Ainsi, cette étude a révélé la présence d'interactions entre *S. cerevisiae* et *L. thermotolerans* au cours de la fermentation alcoolique. La compétition pour les nutriments comme l'oxygène ou les phytostérols du moût n'avait encore jamais été analysée pour ce couple de levure, malgré l'importance qu'une telle interaction peut engendrer sur la croissance de *S. cerevisiae* (Deytieux et al., 2005; Luparia et al., 2004; Salmon, 2006). En plus de la compétition, un effet important du contact entre les cellules de ces deux espèces a été clairement mis en avant. Des phénomènes de contact cellule-cellule entre ces levures a déjà été rapporté dans la littérature, mais toujours avec un effet négatif uniquement sur *L. thermotolerans* (Kemsawasd et al., 2015a; Nissen et al., 2003). C'est la première fois à notre connaissance qu'une interaction négative d'une non-*Saccharomyces* est reportée sur les performances et la croissance de *S. cerevisiae* au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de raisin en fermentation séquentielle. Il est néanmoins fort possible que l'effet souche joue un rôle dans les différences observées entre les études précédentes et celle-ci.

L'analyse du transcriptome de *S. cerevisiae* et *L. thermotolerans* par RNA-sequencing aurait été une parfaite suite à cette étude. Malheureusement, le protocole mis en place pour extraire des ARN de qualité suffisante pour cette analyse très pointue et sensible n'a pas donné les résultats attendus. La plateforme en charge du RNA-sequencing a rencontré des problèmes lors de l'amplification des ADNc par PCR nécessaire à la construction des bibliothèques de séquençage, très certainement dû à la présence d'inhibiteurs de PCR dans nos échantillons comme les polyphénols du moût (Phister and Mills, 2003).

## Conclusion – Perspectives

L'utilisation des levures non-*Saccharomyces* au cours de la vinification est de plus en plus répandue, avec différents buts comme la modulation de la complexité aromatique, la bio-protection ou encore la diminution de la teneur en alcool des vins. Néanmoins, ces levures, qu'elles soient indigènes ou ajoutées par les vignerons, sont rarement capables de réaliser une fermentation alcoolique complète et rapide, et une souche de *S. cerevisiae* est donc ajoutée pour assurer la fermentation. Mais depuis quelques années, il a été mis en évidence que des interactions ont lieu entre les levures non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae*, en général au détriment des non-*Saccharomyces* ce qui peut limiter l'impact de ces souches sur le produit et limiter aussi l'intérêt de leur utilisation. De ce fait, l'étude des interactions entre ces deux espèces est devenue un enjeu majeur afin de proposer des associations *S. cerevisiae*/non-*Saccharomyces* efficaces pour les effets souhaités cités ci-dessus. L'approche proposée dans cette thèse a permis de suivre quelques paramètres physiologiques que sont la viabilité, l'accumulation de lipides et de ROS dans les cellules au cours de fermentations alcooliques. Il serait nécessaire d'élargir les tests en utilisant d'autres marqueurs fluorescents spécifiques de paramètres physiologiques comme le DiBAC<sub>4</sub>(3) pour le potentiel membranaire ou encore le 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein (BCECF) et le pHrodo pour le pH intracellulaire (pHi). En effet, le DiBAC<sub>4</sub>(3) (aussi appelé Bis-oxonol ou BOX) ne peut entrer dans les cellules que si leur membrane plasmique est dépolarisée, reflétant une difficulté des cellules à maintenir leur potentiel membranaire (Zandycke et al., 2003). Ce fluorochrome est surtout utilisé avec les bactéries et encore assez peu sur levures. Par ailleurs, malgré un pH acide dans le moût, les cellules doivent maintenir leur pHi optimal pour croître et fermenter correctement. L'analyse du pHi peut se faire avec l'utilisation de fluorochromes sensibles au pH comme le BCECF et le pHrodo, ne libérant une fluorescence qu'à certaines plages de pH, permettant de détecter une éventuelle chute du pHi. Une alternative à cette méthode avec un autre fluorochrome sensible au pH, le cFDA-Succinimidyl Ester (cFDA-SE), permet de calculer une valeur numérique du pHi en établissant préalablement des courbes étalons à différents pH. Cette technique a été utilisée avec succès sur la bactérie du vin *Oenococcus oeni* ainsi que sur la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis*, mais dans des milieux de cultures et non en conditions réelles œnologiques (moût ou vin) (Bouix and Ghorbal, 2015; Capusoni et al., 2016). Pour mettre au point l'utilisation de ces fluorochromes, la recherche d'inhibiteurs du marquage et le cas échéant de solutions pour éliminer ces inhibiteurs dans le moût sera une étape importante pour comprendre et palier aux échecs rencontrés pour les marquages. Ces différents

paramètres physiologiques permettraient de cibler plus précisément les effets des interactions entre *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces*, pour d'un côté sélectionner les souches permettant d'avoir un couple performant et d'un autre côté mieux comprendre la mécanistique des interactions. Ces marquages pourraient aussi déboucher sur d'autres analyses en fonction des résultats obtenus.

L'étude plus approfondie des interactions entre *S. cerevisiae* et *L. thermotolerans* a permis de consolider l'effet négatif de cette non-*Saccharomyces* sur *S. cerevisiae* en ce qui concerne la biomasse et l'activité fermentaire. Grâce à ces résultats, il apparaît que les interactions entre *L. thermotolerans* et *S. cerevisiae* sont en partie liées à une compétition pour les nutriments, couplée à un effet du contact cellule-cellule. Il serait intéressant de poursuivre dans cette voie pour déterminer avec plus de précision le mécanisme d'action du contact cellule-cellule, en regardant par exemples la composition de la paroi des deux espèces de levures (mannoprotéines, polysaccharides, ...) en comparant une co-fermentation de *S. cerevisiae* avec *L. thermotolerans* et une fermentation pure de chaque espèce. L'ajout de cellules de *S. cerevisiae* vivantes ou mortes dans différentes proportions lors de la fermentation de la non-*Saccharomyces* serait aussi à envisager, comme proposé dans les études de Nissen et al. (2003), Renault et al. (2013) et plus récemment par Englezos et al. (2019). Cela permettrait de savoir si le contact direct ou une forte proximité est nécessaire pour une interaction entre les deux espèces, et surtout si le mécanisme est produit par la levure durant sa croissance en présence de l'autre espèce ou bien présent naturellement.

Il apparaît ainsi essentiel de pouvoir étudier le contact cellule-cellule, mécanisme de plus en plus évoqué dans les interactions *S. cerevisiae*/non-*Saccharomyces*, mais pour cela il est nécessaire d'avoir le matériel adéquat. Il serait donc intéressant d'améliorer notre système d'étude du contact cellule-cellule, en utilisant par exemple des fermenteurs à deux compartiments ou plus séparés par une membrane. Cela permettrait d'étudier une ou plusieurs non-*Saccharomyces* en co-fermentation avec *S. cerevisiae* et de pouvoir étudier plusieurs paramètres comme l'exo-metabolome, les composés volatiles ou les nutriments, mais aussi de pouvoir regarder de manière indépendante ce qu'il se passe dans les cellules (endo-metabolome, extraction d'ARN, composition en lipides de la membrane, ...).

En ce qui concerne l'analyse du transcriptome, la présence d'inhibiteurs dans nos échantillons d'ARN ont gêné le bon déroulement de leur préparation en vue d'effectuer un RNA-sequencing. Le protocole mis en place nécessite donc une ou plusieurs modifications afin de palier à la

présence d'inhibiteurs. Il serait aussi intéressant de réaliser les fermentations en moût synthétique, en évitant ainsi la présence des polyphénols du moût connu pour être des inhibiteurs de PCR. Le RNA-sequencing pourrait ainsi être réalisé, et apporter de nouvelles connaissances sur les voies métaboliques impliquées dans les interactions entre *S. cerevisiae* et *L. thermotolerans*. En restant dans le domaine de la biologie moléculaire, l'utilisation de mutants (banques de mutants référencées par exemple) dont la fonction perdue est connue permettrait aussi de remonter à certaines voies métaboliques impliquées dans les interactions.

De plus, d'autres techniques pourraient être envisagées pour tenter d'élucider ces interactions, comme la protéomique puisqu'il a été proposé dans d'autres études que l'inhibition de croissance de certaines non-*Saccharomyces* serait due à la production de peptides anti-microbiens. Dans notre étude, l'effet du contact cellule-cellule a été souligné mais lors de la fermentation alcoolique sans contact, l'inhibition de croissance est aussi visible chez les deux espèces (diminution de la population pour *S. cerevisiae* et perte de viabilité pour *L. thermotolerans*), démontrant peut-être la présence d'un composé inhibiteur qui pourrait être un peptide anti-microbien. De plus, d'autres protéines pourraient être affectées par la présence de l'autre espèce, avec soit une surproduction ou au contraire une sous voire absence de production, dérégulant le métabolisme de la cellule.

Il serait aussi intéressant d'appliquer ces différentes analyses à d'autres espèces de non-*Saccharomyces* que celles étudiées dans cette thèse, et pourquoi pas d'autres souches de *S. cerevisiae* aussi notamment avec la séparation physique des espèces. De plus, étudier d'autres matrices comme le vin rouge permettrait d'étendre l'analyse des interactions entre non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae*.

## Références

- Aguilera, F., Peinado, R.A., Millán, C., Ortega, J.M., Mauricio, J.C., 2006. Relationship between ethanol tolerance, H<sup>+</sup>-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology* 110, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.02.002>
- Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., Gírio, F., 2009. *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 965–972. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2409-6>
- Albertin, W., Zimmer, A., Miot-Sertier, C., Bernard, M., Coulon, J., Moine, V., Colonna-Ceccaldi, B., Bely, M., Marullo, P., Masneuf-Pomarede, I., 2017. Combined effect of the *Saccharomyces cerevisiae* lag phase and the non-*Saccharomyces* consortium to enhance wine fruitiness and complexity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 7603–7620. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8492-1>
- Albuquerque, P., Casadevall, A., 2012. Quorum sensing in fungi – a review. *Medical Mycology* 50, 337–345. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.652201>
- Alem, M.A.S., Otef, M.D.Y., Flowers, T.H., Douglas, L.J., 2006. Production of Tyrosol by *Candida albicans* Biofilms and Its Role in Quorum Sensing and Biofilm Development. *Eukaryotic Cell* 5, 1770–1779. <https://doi.org/10.1128/EC.00219-06>
- Alexandre, H., Charpentier, C., 1998. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *Journal of Industrial microbiology & biotechnology* 20, 20–27.
- Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C., 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiology Letters* 124, 17–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07255.x>
- Andorra, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., Mas, A., 2011. Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. *Food Microbiology* 28, 1483–1491. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.009>
- Anfang, N., Brajkovich, M., Goddard, M.R., 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x>
- Balikci, E.K., Tanguler, H., Jolly, N.P., Erten, H., 2016. Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. *Yeast* 33, 313–321. <https://doi.org/10.1002/yea.3166>
- Barbosa, C., Mendes-Faia, A., Lage, P., Mira, N.P., Mendes-Ferreira, A., 2015. Genomic expression program of *Saccharomyces cerevisiae* along a mixed-culture wine fermentation with *Hanseniaspora guilliermondii*. *Microbial Cell Factories* 14. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0318-1>
- Barrajón, N., Arévalo-Villena, M., Úbeda, J., Briones, A., 2011. Enological properties in wild and commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts: relationship with competition during alcoholic fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 2703–2710. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0744-0>
- Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine—a review. *South African Journal for Enology and Viticulture* 21, 27–51.
- Beckner Whitener, M.E., Carlin, S., Jacobson, D., Weighill, D., Divol, B., Conterno, L., Du Toit, M., Vrhovsek, U., 2015. Early fermentation volatile metabolite profile of non-*Saccharomyces* yeasts in red and white grape must: A targeted approach. *LWT - Food Science and Technology* 64, 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.018>
- Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Benito, S., Santos, A., 2017. Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 257, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028>
- Bell, S.-J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 242–295.
- Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozès, N., 2008. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology* 121, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.030>
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., Barre, P., 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70, 246–252. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90057-4)
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarede, I., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122, 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>



- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., Benito, S., 2016. Quality and Composition of Airén Wines Fermented by Sequential Inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol Biotechnol* 54, 135–144. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.02.16.4220>
- Benito, S., 2018. The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Appl Microbiol Biotechnol* 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0>
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., Fritsch, S., Röcker, J., Rauhut, D., 2015. Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur Food Res Technol* 241, 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2497-8>
- Beopoulos, A., Nicaud, J.-M., Gaillardin, C., 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 1193–1206. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3212-8>
- Bevan, E.A., Makower, M., 1963. The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc. Int. Congr. Genet.*
- Blateyron, L., Sablayrolles, J.M., 2001. Stuck and Slow Fermentations in Enology: Statistical Study of Causes and Effectiveness of Combined Additions of Oxygen and Diammonium Phosphate 6.
- Bokulich, N.A., Ohta, M., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2013. Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. *PLOS ONE* 8, e66437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066437>
- Bouix, M., Ghorbal, S., 2015. Rapid assessment of *Oenococcus oeni* activity by measuring intracellular pH and membrane potential by flow cytometry, and its application to the more effective control of malolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 193, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.019>
- Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M.G., Caldeira, J., Albergaria, H., 2014. Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 843–853. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5411-y>
- Breeuwer, P., Drocourt, J.L., Bunschoten, N., Zwietering, M.H., Rombouts, F.M., Abee, T., 1995. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1614–1619.
- Calleja, G.B., 1984. Microbial aggregation. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Capece, A., Romaniello, R., Poeta, C., Siesto, G., Massari, C., Pietrafesa, R., Romano, P., 2011. Control of inoculated fermentations in wine cellars by mitochondrial DNA analysis of starter yeast. *Annals of Microbiology* 61, 49–56. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0087-3>
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Pietrafesa, R., Massari, C., Poeta, C., Romano, P., 2010. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 144, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.009>
- Capece, A., Siesto, G., Romaniello, R., Lagreca, V.M., Pietrafesa, R., Calabretti, A., Romano, P., 2013. Assessment of competition in wine fermentation among wild *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Sangiovese grapes in Tuscany region. *LWT - Food Science and Technology* 54, 485–492. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.001>
- Capusoni, C., Arioli, S., Zambelli, P., Muktaduzzaman, M., Mora, D., Compagno, C., 2016. Effects of oxygen availability on acetic acid tolerance and intracellular pH in *Dekkera bruxellensis*. *Applied and Environmental Microbiology* AEM.00515-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.00515-16>
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., Madeo, F., 2010. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ* 17, 763–773. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.219>
- Carrau, F.M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P.A., Dellacassa, E., 2008. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Research* 8, 1196–1207. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x>
- Castela, P.M. (Universite d'Extremadure, Mesias, J.L., Maynar, J.I., 1985. Evolution of amounts of total, neutral and polar lipids in Macabeo grapes (*Vitis vinifera*) throughout their vegetative cycle. *Science des Aliments* (France).
- Caveda, L., Martin-Padura, I., Navarro, P., Breviario, F., Corada, M., Gulino, D., Lampugnani, M.G., Dejana, E., 1996. Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J Clin Invest* 98, 886–893. <https://doi.org/10.1172/JCI118870>
- Charoenchai, C., Fleet, G. h., Henschke, P. a., Todd, B. e. n. ., 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 3, 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x>
- Chasseriaud, L., Coulon, J., Marullo, P., Albertin, W., Bely, M., 2018. New oenological practice to promote non-*Saccharomyces* species of interest: saturating grape juice with carbon dioxide. *Appl Microbiol Biotechnol* 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8861-4>
- Chen, H., Fink, G.R., 2006. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev.* 20, 1150–1161. <https://doi.org/10.1101/gad.1411806>

- Ciani, M., 1997. Role, enological properties and potential biotechnological use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Recent Res. Devel. in Microbiology* 1, 317-331
- Ciani, M., Beco, L., Comitini, F., 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012>
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., Romano, P., 2016. Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00555>
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P., 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research* 10, 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>
- Civitelli, R., 2008. Cell–cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Highlight Issue: Bone Remodeling: Facts and Perspectives 473, 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.04.005>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28, 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Costa, V., Moradas-Ferreira, P., 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 22, 217–246. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(01\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(01)00012-7)
- Crépin, L., Truong, N.M., Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2017. Management of multiple nitrogen sources during wine fermentation by *S. cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.02617-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02617-16>
- Criddle, R.S., Schatz, G., 1969. Promitochondria of anaerobically grown yeast. I. Isolation and biochemical properties. *Biochemistry* 8, 322–334. <https://doi.org/10.1021/bi00829a045>
- Czabany, T., Athenstaedt, K., Daum, G., 2007. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, Regulation of Lipid Metabolism in Yeast* 1771, 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.001>
- Davey, H.M., Hexley, P., 2011. Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environmental Microbiology* 13, 163–171. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02317.x>
- Delobel, P., Pradal, M., Blondin, B., Tesniere, C., 2012. A ‘fragile cell’ sub-population revealed during cytometric assessment of *Saccharomyces cerevisiae* viability in lipid-limited alcoholic fermentation. *Letters in Applied Microbiology* 55, 338–344. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03301.x>
- Deytieux, C., Mussard, L., Biron, M.-J., Salmon, J.-M., 2005. Fine measurement of ergosterol requirements for growth of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 68, 266–271. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1872-3>
- Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D., Zhang, K., 2009. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 253–263. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2223-1>
- Dive, C., Cox, H., Watson, J.V., Workman, P., 1988. Polar fluorescein derivatives as improved substrate probes for flow cytoenzymological assay of cellular esterases. *Molecular and Cellular Probes* 2, 131–145. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(88\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0890-8508(88)90035-7)
- Engle, E.K., Fay, J.C., 2012. Divergence of the Yeast Transcription Factor FZF1 Affects Sulfite Resistance. *PLOS Genetics* 8, e1002763. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002763>
- Englezos, V., Cocolin, L., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Bloem, A., Dequin, S., Camarasa, C., 2018a. Specific phenotypic traits of *Starmerella bacillaris* regarding nitrogen source consumption and central carbon metabolites production during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.00797-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00797-18>
- Englezos, V., Cravero, F., Torchio, F., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Lambri, M., Gerbi, V., Rolle, L., Cocolin, L., 2018b. Oxygen availability and strain combination modulate yeast growth dynamics in mixed culture fermentations of grape must with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 69, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.007>
- Englezos, V., Rantsiou, K., Giacosa, S., Río Segade, S., Rolle, L., Cocolin, L., 2019. Cell-to-cell contact mechanism modulates *Starmerella bacillaris* death in mixed culture fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 289, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.009>
- Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., Cocolin, L., 2015. Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations. *International Journal of Food Microbiology* 199, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.009>
- Englezos, V., Torchio, F., Cravero, F., Marengo, F., Giacosa, S., Gerbi, V., Rantsiou, K., Rolle, L., Cocolin, L., 2016. Aroma profile and composition of Barbera wines obtained by mixed fermentations of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) and *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT* 73, 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.063>

- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramon, D., Querol, A., 1998. The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *International Microbiology* 1, 143–148.
- Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research* 8, 979–995. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>
- Fleet, G.H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 23rd International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY-23) 86, 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)
- Fleet, G.H., 1993. *Wine Microbiology and Biotechnology*. CRC Press.
- Fleet, G.H., Heard, G.M., 1993. Yeasts-growth during fermentation *Wine Microbiology and Biotechnology*, 27–54.
- Fleet, G.H., Prakitchaiwattana, C.J., Beh, Heard, G.M., 2002. The yeast ecology of wine grapes *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*, 1–17.
- Fornairon-Bonnefond, C., Salmon, J.-M., 2003. Impact of Oxygen Consumption by Yeast Lees on the Autolysis Phenomenon during Simulation of Wine Aging on Lees. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2584–2590. <https://doi.org/10.1021/jf0259819>
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., Sarniguet, A., 2011. Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 583–609. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-11>
- Fukuhara, S., Tomita, S., Yamashiro, S., Morisaki, T., Yutani, C., Kitamura, S., Nakatani, T., 2003. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 125, 1470–1479. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(02\)73610-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(02)73610-6)
- Ganini, D., Leinisch, F., Kumar, A., Jiang, J., Tokar, E.J., Malone, C.C., Petrovich, R.M., Mason, R.P., 2017. Fluorescent proteins such as eGFP lead to catalytic oxidative stress in cells. *Redox Biology* 12, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.002>
- Garcia, A., Carcel, C., Dulau, L., Samson, A., Aguera, E., Agosin, E., Günata, Z., 2002. Influence of a Mixed Culture with *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* on the Volatiles of a Muscat Wine. *Journal of Food Science* 67, 1138–1143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09466.x>
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Arroyo, T., 2016. Non-*Saccharomyces* Yeasts: Biotechnological Role for Wine Production, in: Morata, A., Loira, I. (Eds.), *Grape and Wine Biotechnology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64957>
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Crespo, J., Cabellos, J.M., Arroyo, T., 2017. Yeast Monitoring of Wine Mixed or Sequential Fermentations Made by Native Strains from D.O. “Vinos de Madrid” Using Real Time Quantitative PCR. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02520>
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology* 33, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
- Gobert, A., Tournet-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Alexandre, H., 2017. Non-*Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences: Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02175>
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., Helden, J. van, André, B., 2007. Effect of 21 Different Nitrogen Sources on Global Gene Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 27, 3065–3086. <https://doi.org/10.1128/MCB.01084-06>
- González, B., Vázquez, J., Morcillo-Parra, M.Á., Mas, A., Torija, M.J., Beltran, G., 2018. The production of aromatic alcohols in non-*Saccharomyces* wine yeast is modulated by nutrient availability. *Food Microbiology* 74, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.003>
- Gonzalez, R., Quirós, M., Morales, P., 2013. Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: A promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends in Food Science & Technology* 29, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.015>
- Grangeteau, C., 2016. Biodiversité fongique du raisin au vin : impact de l'activité anthropique. Thèse de doctorat en microbiologie, Université de Bourgogne Franche-Comté, 280. <http://www.theses.fr/2016DIJOS040>.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., Fowler, S.D., 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100, 965–973. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>
- Hansen, E.H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., Arneborg, N., 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology* 91, 541–547. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01426.x>
- Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., Maris, A.J.A. van, Pronk, J.T., Dickinson, J.R., 2008. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2259–2266. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>
- Heard, G. m., Fleet, G. h., 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb04312.x>

- Heim, R., Tsien, R.Y., 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology* 6, 178–182. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00450-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00450-5)
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., Cabisco, E., 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Redox control of cell function 1780, 1217–1235. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.004>
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, Á., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006. Real-Time Quantitative PCR (QPCR) and Reverse Transcription-QPCR for Detection and Enumeration of Total Yeasts in Wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7148–7155. <https://doi.org/10.1128/AEM.00388-06>
- Hirst, M.B., Richter, C.L., 2016. Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in Beverage Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 67, 361–370. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.15098>
- Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., Arneborg, N., 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology* 91, 541–547.
- Hranilovic, A., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Jiranek, V., Albertin, W., 2017. The evolution of *Lachancea thermotolerans* is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184652>
- Imhof, B.A., Vollmers, H.P., Goodman, S.L., Birchmeier, W., 1983. Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: Specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell* 35, 667–675. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90099-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90099-5)
- Johnson, B.F., Walker, T., Calleja, G.B., Seligy, V.L., 1988. Sexual co-flocculation and asexual self-flocculation in budding and fission yeasts: experimental establishment of a fundamental difference. *Can. J. Microbiol.* 34, 1105–1107. <https://doi.org/10.1139/m88-195>
- Jolly, J., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., others, 2006. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal for Enology and Viticulture* 27, 15.
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.R., Pretorius, I.S., 2003. The Effect of Non-*Saccharomyces* Yeasts on Fermentation and Wine Quality. *South African Journal of Enology and Viticulture* 24, 55–62.
- Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S., 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* 14, 215–237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>
- Kalyanaraman, B., Zielonka, J., 2017. Green fluorescent proteins induce oxidative stress in cells: A worrisome new wrinkle in the application of the GFP reporter system to biological systems? *Redox Biol* 12, 755–757. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.019>
- Kanehisa, M., Goto, S., 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 28, 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., Tanabe, M., 2012. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res* 40, D109–D114. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr988>
- Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., Spyropoulos, H., 2005. Growth and Fermentation Characteristics of a Strain of the Wine Yeast *Kluyveromyces thermotolerans* Isolated in Greece. *World J Microbiol Biotechnol* 21, 1599–1602. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-8220-3>
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., Nerantzis, E., 2006. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol* 23, 735–739. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9283-5>
- Kemsawasd, V., Branco, P., Almeida, M.G., Caldeira, J., Albergaria, H., Arneborg, N., 2015a. Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* 362, fnv103. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv103>
- Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., Arneborg, N., 2015b. Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 10191–10207. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6835-3>
- King, E.S., Swiegers, J.H., Travis, B., Francis, I.L., Bastian, S.E.P., Pretorius, I.S., 2008. Coinoculated Fermentations Using *Saccharomyces* Yeasts Affect the Volatile Composition and Sensory Properties of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc Wines. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10829–10837. <https://doi.org/10.1021/jf801695h>
- Kitagaki, H., Shimoi, H., 2007. Mitochondrial dynamics of yeast during sake brewing. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104, 227–230. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.227>
- Kitagaki, H., Takagi, H., 2014. Mitochondrial metabolism and stress response of yeast: Applications in fermentation technologies. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117, 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.09.011>

- Koch, B., Schmidt, C., Daum, G., 2014. Storage lipids of yeasts: a survey of nonpolar lipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews* 38, 892–915. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12069>
- Kurtzman, C., 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS Yeast Research* 4, 233–245. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00175-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00175-2)
- Kurtzman, C., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier.
- Lai, L.-C., Kosorukoff, A.L., Burke, P.V., Kwast, K.E., 2005. Dynamical Remodeling of the Transcriptome during Short-Term Anaerobiosis in *Saccharomyces cerevisiae*: Differential Response and Role of Msn2 and/or Msn4 and Other Factors in Galactose and Glucose Media. *Molecular and Cellular Biology* 25, 4075–4091. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.10.4075-4091.2005>
- Lai, Q.P., 2010. Utilisation de levures non *Saccharomyces* en œnologie : études des interactions entre *Torulaspora delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes. Thèse de doctorat en génie des procédés et de l'environnement, Université de Toulouse, 180. <http://www.theses.fr/2010INPT0078>.
- Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D., Mannazzu, I., 2008. ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780, 892–898. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.008>
- Le Fur, Y., Olsson, A., Bard, M.-H., Hory, C., 1994. Evolution of phytosterols in Chardonnay grape berry skins during last stages of ripening 5.
- Liu, P.-T., Lu, L., Duan, C.-Q., Yan, G.-L., 2016. The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology* 71, 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.031>
- Liu, Y., Forcisi, S., Harir, M., Deleris-Bou, M., Krieger-Weber, S., Lucio, M., Longin, C., Degueurce, C., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., 2016. New molecular evidence of wine yeast-bacteria interaction unraveled by non-targeted exometabolomic profiling. *Metabolomics* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1001-1>
- Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., 2015. Wine microbiome, a dynamic world of microbial interactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 0, 00–00. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.983591>
- Lleixà, J., Manzano, M., Mas, A., Portillo, M. del C., 2016. *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Competition during Microvinification under Different Sugar and Nitrogen Conditions. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01959>
- Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., Alexandre, H., 2017. Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiology* 62, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.023>
- Lopez, C.L.F., Beaufort, S., Brandam, C., Taillandier, P., 2014. Interactions between *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in tequila must type medium fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 30, 2223–2229. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1643-y>
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 23rd International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY-23) 86, 23–50. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00246-0)
- Luparia, V., Soubeyrand, V., Berges, T., Julien, A., Salmon, J.-M., 2004. Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 25–32. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1549-3>
- Magyar, I., Tóth, T., 2011. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.011>
- Mannazzu, I., Angelozzi, D., Belviso, S., Budroni, M., Farris, G.A., Goffrini, P., Lodi, T., Marzona, M., Bardi, L., 2008. Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: Cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *International Journal of Food Microbiology* 121, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.003>
- Marsit, S., Mena, A., Bigey, F., Sauvage, F.-X., Couloux, A., Guy, J., Legras, J.-L., Barrio, E., Dequin, S., Galeote, V., 2015. Evolutionary Advantage Conferred by an Eukaryote-to-Eukaryote Gene Transfer Event in Wine Yeasts. *Mol Biol Evol* 32, 1695–1707. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv057>
- Masneuf-Pomarede, I., Juquin, E., Miot-Sertier, C., Renault, P., Laizet, Y., Salin, F., Alexandre, H., Capozzi, V., Cocolin, L., Colonna-Ceccaldi, B., Englezos, V., Girard, P., Gonzalez, B., Lucas, P., Mas, A., Nisiotou, A., Sipiczki, M., Spano, G., Tassou, C., Bely, M., Albertin, W., 2015. The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments. *FEMS Yeast Res* 15. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov045>

- McFaline-Figueroa, J.R., Vevea, J., Swayne, T.C., Zhou, C., Liu, C., Leung, G., Boldogh, I.R., Pon, L.A., 2011. Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother–daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging Cell* 10, 885–895. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00731.x>
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., 2012. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 157, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012>
- Mendes-Ferreira, A., Sampaio-Marques, B., Barbosa, C., Rodrigues, F., Costa, V., Mendes-Faia, A., Ludovico, P., Leão, C., 2010. Accumulation of Non-Superoxide Anion Reactive Oxygen Species Mediates Nitrogen-Limited Alcoholic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7918–7924. <https://doi.org/10.1128/AEM.01535-10>
- Mills, D.A., Johannsen, E.A., Cocolin, L., 2002. Yeast Diversity and Persistence in Botrytis-Affected Wine Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4884–4893. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4884-4893.2002>
- Mora, J., Barbas, J.I., Mulet, A., 1990. Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 156–159.
- Moradas-Ferreira, P., Costa, V., 2013. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Report*.
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., Gonzalez, R., 2015. The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 3993–4003. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6321-3>
- Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2005. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 103, 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.029>
- Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* 150, 199–204. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)80036-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80036-9)
- Müllner, H., Daum, G., 2004. Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta biochimica Polonica* 51, 323–347.
- Nissen, P., Arneborg, N., 2003. Characterization of early deaths of non- *Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 180, 257–263. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0585-9>
- Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell–cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20, 331–341. <https://doi.org/10.1002/yea.965>
- Odum, E., 1959. *Fundamentals of ecology*.
- Oro, L., Ciani, M., Comitini, F., 2014. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J Appl Microbiol* 116, 1209–1217. <https://doi.org/10.1111/jam.12446>
- Padilla, B., Gil, J.V., Manzanares, P., 2016. Past and Future of Non-*Saccharomyces* Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Saccharomyces* 411. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
- Pardo, I., García, M.J., Zúñiga, M., Uruburu, F., 1989. Dynamics of Microbial Populations during Fermentation of Wines from the Utiel-Requena Region of Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 539–541.
- Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., Girio, F., 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 108, 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.012>
- Perrone, G.G., Tan, S.-X., Dawes, I.W., 2008. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Apoptosis in yeast* 1783, 1354–1368. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.023>
- Phister, T.G., Mills, D.A., 2003. Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7430–7434. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7430-7434.2003>
- Pina, C., Santos, C., Couto, J.A., Hogg, T., 2004. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. *Food Microbiology* 21, 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.009>
- Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H., Heard, G.M., 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4, 865–877. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.05.004>
- Ramage, G., Saville, S.P., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L., 2002. Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5459–5463. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5459-5463.2002>
- Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G., Rolle, L., Cocolin, L., 2012. *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.06768-11. <https://doi.org/10.1128/AEM.06768-11>

- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J.-C., Bely, M., 2015. Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii/S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *International Journal of Food Microbiology* 207, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037>
- Renault, P.E., Albertin, W., Bely, M., 2013. An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 4105–4119. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4660-5>
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2005. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 316–327. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00031.x>
- Ritt, J.-F., Remize, F., Grandvalet, C., Guzzo, J., Atlan, D., Alexandre, H., 2009. Peptidases specific for proline-containing peptides and their unusual peptide-dependent regulation in *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology* 106, 801–813. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04032.x>
- Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, F., Manzanares, P., 2001a. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 70, 283–289. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00552-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00552-9)
- Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, F., Manzanares, P., 2001b. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 70, 283–289. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00552-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00552-9)
- Rollero, S., Mouret, J.-R., Bloem, A., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., Camarasa, C., 2017. Quantitative <sup>13</sup>C-isotope labelling-based analysis to elucidate the influence of environmental parameters on the production of fermentative aromas during wine fermentation. *Microbial Biotechnology* 10, 1649–1662. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12749>
- Rollero, S., Mouret, J.-R., Sanchez, I., Camarasa, C., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., 2016. Key role of lipid management in nitrogen and aroma metabolism in an evolved wine yeast strain. *Microbial Cell Factories* 15. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0434-6>
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., 1992. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 126–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01698.x>
- Rosenfeld, E., Beauvoit, B., 2003. Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20, 1115–1144. <https://doi.org/10.1002/yea.1026>
- Rossouw, D., Bagheri, B., Setati, M.E., Bauer, F.F., 2015. Co-Flocculation of Yeast Species, a New Mechanism to Govern Population Dynamics in Microbial Ecosystems. *PLOS ONE* 10, e0136249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136249>
- Rossouw, D., Meiring, S.P., Bauer, F.F., 2018. Modifying *Saccharomyces cerevisiae* Adhesion Properties Regulates Yeast Ecosystem Dynamics. *mSphere* 3, e00383-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00383-18>
- Roullier-Gall, Chloé, Boutegrabet, L., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., 2014. A grape and wine chemodiversity comparison of different appellations in Burgundy: Vintage vs terroir effects. *Food Chemistry* 152, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.056>
- Roullier-Gall, Chloé, Witting, M., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., 2014. High precision mass measurements for wine metabolomics. *Frontiers in Chemistry* 2. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00102>
- Roullier-Gall, C., Witting, M., Tziotis, D., Ruf, A., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., 2015. Integrating analytical resolutions in non-targeted wine metabolomics. *Tetrahedron* 71, 2983–2990. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.02.054>
- Sablayrolles, J.-M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.-L., Barre, P., 1996. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82, 377–381. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89154-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89154-9)
- Sadoudi, M., 2014. Intérêts biotechnologiques des levures indigènes non *Saccharomyces*. Thèse de doctorat en microbiologie. <http://www.theses.fr/s81726>.
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H., 2012. Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology* 32, 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>
- Salmon, J.-M., 2006. Interactions between yeast, oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations: Practical implications. *LWT - Food Science and Technology, European Symposium on Apple Processing* 39, 959–965. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.11.005>
- Salmon, J.-M., Fornairon, C., Barre, P., 1998. Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86, 154–163. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80054-8](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80054-8)
- Sangorrín, M.P., Zajonskovsky, I.E., Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Broock, M.R.G. de van, Caballero, A.C., 2001. Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). *Journal of Basic Microbiology* 41, 105–113. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200105\)41:2<105::AID-JOBM105>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200105)41:2<105::AID-JOBM105>3.0.CO;2-W)

- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., Rinehart, K.L., Farrand, S.K., 1997. Detecting and characterizing N-acetyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *PNAS* 94, 6036–6041.
- Shekhawat, K., Bauer, F.F., Setati, M.E., 2017. Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 2479–2491. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8001-y>
- Sieuwert, S., Bok, F.A.M. de, Hugenholtz, J., Vlieg, J.E.T. van H., 2008. Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4997–5007. <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-08>
- Simonin, S., Alexandre, H., Nikolantonaki, M., Coelho, C., Tourdot-Maréchal, R., 2018. Inoculation of *Torulaspora delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking. *Food Research International* 107, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.034>
- Sipiczki, M., 2006. *Metschnikowia* Strains Isolated from Botrytized Grapes Antagonize Fungal and Bacterial Growth by Iron Depletion. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6716–6724. <https://doi.org/10.1128/AEM.01275-06>
- Sipiczki, M., 2003. *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 2079–2083. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02649-0>
- Sitepu, I.R., Ignatia, L., Franz, A.K., Wong, D.M., Faulina, S.A., Tsui, M., Kanti, A., Boundy-Mills, K., 2012. An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *Journal of Microbiological Methods* 91, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.09.001>
- Slater, E.C., 1972. THE RESPIRATORY CHAIN AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION, in: *The Molecular Basis of Electron Transport*. Elsevier, pp. 95–117. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-632650-5.50008-1>
- Soares, E. v., 2011. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Journal of Applied Microbiology* 110, 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x>
- Stratford, M., Anslow, P.A., 1996. Comparison of the inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids. *FEMS Microbiology Letters* 142, 53–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08407.x>
- Strauss, M. I. a., Jolly, N. p., Lambrechts, M. g., Van Rensburg, P., 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 91, 182–190. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x>
- Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., Brandam, C., 2014. Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World J Microbiol Biotechnol* 30, 1959–1967. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1618-z>
- Taillandier, P., Ramon Portugal, F., Fuster, A., Strehaiano, P., 2007. Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiology* 24, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.002>
- Tehlivets, O., Scheuringer, K., Kohlwein, S.D., 2007. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, Regulation of Lipid Metabolism in Yeast* 1771, 255–270. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.004>
- Tempère, S., Marchal, A., Barbe, J.-C., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Marullo, P., Albertin, W., 2018. The complexity of wine: clarifying the role of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, 3995–4007. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8914-8>
- Tesnière, C., Delobel, P., Pradal, M., Blondin, B., 2013. Impact of Nutrient Imbalance on Wine Alcoholic Fermentations: Nitrogen Excess Enhances Yeast Cell Death in Lipid-Limited Must. *PLoS ONE* 8, e61645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061645>
- Tilloy, V., 2013. Développement de nouvelles souches de levures oenologiques à faible rendement en éthanol par évolution adaptative Thèse de doctorat en microbiologie, Montpellier SupAgro, 286. <http://www.theses.fr/2013NSAM0009>.
- Tofalo, R., Schirone, M., Torriani, S., Rantsiou, K., Cocolin, L., Perpetuini, G., Suzzi, G., 2012. Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiology* 29, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.014>
- Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozès, N., 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology* 85, 127–136. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00506-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00506-8)
- Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 345–352. <https://doi.org/10.1023/A:1012027718701>
- Valera, M.J., Morcillo-Parra, M.Á., Zagórska, I., Mas, A., Beltran, G., Torija, M.J., 2019. Effects of melatonin and tryptophol addition on fermentations carried out by *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast species under



- different nitrogen conditions. *International Journal of Food Microbiology* 289, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.013>
- Varela, C., Torrea, D., Schmidt, S.A., Ancin-Azpilicueta, C., Henschke, P.A., 2012. Effect of oxygen and lipid supplementation on the volatile composition of chemically defined medium and Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry* 135, 2863–2871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.127>
- Viana, F., Gil, J.V., Genovés, S., Vallés, S., Manzanares, P., 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology* 25, 778–785. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.015>
- Viegas, C.A., Rosa, M.F., Sá-Correia, I., Novais, J.M., 1989. Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic Acids Produced during Ethanolic Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 21–28.
- Wang, C., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., 2016. The Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and Non-*Saccharomyces* Yeast during Alcoholic Fermentation is Species and Strain Specific. *Front. Microbiol.* 7, 502. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00502>
- Wang, C., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., 2015. Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 206, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.022>
- Wang, X.D., Bohlscheid, J.C., Edwards, C.G., 2003. Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology* 94, 349–359.
- Williams, K.M., Liu, P., Fay, J.C., 2015. Evolution of ecological dominance of yeast species in high-sugar environments. *Evolution* 69, 2079–2093. <https://doi.org/10.1111/evo.12707>
- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-Martins, I., Gírio, F., 2006. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.025>
- Zandycke, S.M.V., Simal, O., Gualdoni, S., Smart, K.A., 2003. Determination of Yeast Viability Using Fluorophores. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 61, 15–22. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-61-0015>
- Zhang, B., Luan, Y., Duan, C., Yan, G., 2018. Use of *Torulaspora delbrueckii* co-fermentation with two *Saccharomyces cerevisiae* strains with different aromatic characteristic to improve the diversity of red wine aroma profile. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00606>
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.001>
- Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdiou, D., Masneuf-Pomarede, I., 2011. The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release. *International Journal of Food Microbiology* 151, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026>
- Zupan, J., Avbelj, M., Butinar, B., Kosel, J., Šergan, M., Raspor, P., 2013. Monitoring of Quorum-Sensing Molecules during Minifermentation Studies in Wine Yeast. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2496–2505. <https://doi.org/10.1021/jf3051363>

### Résumé

La fermentation alcoolique est l'étape principale de la vinification du moût de raisin conduisant au vin, assurée majoritairement par la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, d'autres levures appelées non-*Saccharomyces* peuvent contribuer à la fermentation alcoolique et surtout moduler la complexité aromatique du vin produit. Le problème récurrent avec l'utilisation de ces levures non-*Saccharomyces* est leur tendance à mourir prématurément au cours de la fermentation alcoolique, perdant ainsi leurs propriétés recherchées dans le produit fini. Ce phénomène est semble-t-il principalement dû à des interactions entre les non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae*. Ces interactions sont la plupart du temps négatives pour les non-*Saccharomyces* et demeure à ce jour non élucidées, notamment à cause de l'effet souche. C'est pourquoi de nombreuses études se concentrent sur la compréhension de ces interactions, en associant une ou plusieurs non-*Saccharomyces* en co-fermentation avec *S. cerevisiae* et réalisant différentes analyses pour tenter d'élucider les mécanismes impliqués. Le but de cette thèse a été d'étudier les interactions entre deux non-*Saccharomyces* d'intérêt oenologique, *Starmerella bacillaris* et *Lachancea thermotolerans*, lors de fermentations séquentielles de moût de raisin avec *S. cerevisiae* (inoculation de *S. cerevisiae* 24 à 48 h après la non-*Saccharomyces*). Un protocole de cytométrie en flux a été mis au point afin de discriminer les populations de levures et de suivre différents paramètres physiologiques (viabilité, accumulation de particules lipidiques et d'espèces réactives de l'oxygène) des levures tout le long de la fermentation. L'intérêt s'est ensuite davantage porté sur le couple *L. thermotolerans*/*S. cerevisiae* en menant des fermentations séquentielles avec ou sans contact physique pour étudier l'effet du contact cellule-cellule, qui s'est révélé être impliqué dans les interactions entre ces deux espèces suite à différentes analyses (compétition pour les nutriments, production de composés volatiles ou encore exo-metabolomes). Ainsi, cette thèse a confirmé l'existence d'interaction entre *S. cerevisiae* et les deux non-*Saccharomyces* étudiées, en mettant en avant un effet négatif de *S. cerevisiae* sur *L. thermotolerans* mais aussi, pour la première fois, de *L. thermotolerans* sur *S. cerevisiae*, notamment sur sa biomasse et la cinétique fermentaire des fermentations séquentielles.

**Mots clés :** *S. cerevisiae*, *L. thermotolerans*, cytométrie en flux, interactions.

### Abstract

Alcoholic fermentation is the main step for winemaking, mainly performed by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. But other wine yeasts called non-*Saccharomyces* may contribute to alcoholic fermentation and improve the wine aroma complexity. The recurrent problem with the use of these non-*Saccharomyces* yeasts is their trend to die off prematurely during alcoholic fermentation, leading to a lack of their interesting aromatic properties searched in the desired wine. This phenomenon appears to be mainly due to interactions with *S. cerevisiae*. These interactions are most of the time negatives but remain unclear because of the species and strain specific response. That is why several studies focused on the comprehension of interactions, associating one or more non-*Saccharomyces* in co-fermentation with *S. cerevisiae* and by performing different analyses to try to elucidate the mechanisms involved. The aim of this PhD was to study interactions between two non-*Saccharomyces* with enological interest in sequential fermentations of grape must with *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* inoculated 24 to 48 h after the non-*Saccharomyces*). A flow cytometry protocol was developed to discriminate yeast populations and to monitor different physiological parameters (viability, lipid droplet and reactive oxygen species accumulation) of yeasts during fermentation. The focus was further done on the couple *L. thermotolerans*/*S. cerevisiae* by performing sequential fermentations with or without physical contact to study the cell-cell contact effect, which appeared to be involved in interactions between these two species as revealed by different analyses (competition for nutrients, volatile compound production or exo-metabolome). Thus, this PhD has confirmed the existence of interactions between *S. cerevisiae* and the two non-*Saccharomyces* studied by putting forward a negative effect of *S. cerevisiae* on *L. thermotolerans* but also, and for the first time, of *L. thermotolerans* on *S. cerevisiae*, especially about its biomass and fermentation kinetics of sequential fermentations.

**Keywords:** *S. cerevisiae*, *L. thermotolerans*, flow cytometry, interactions.