



HAL
open science

Interactome entre micro-organismes au cours la fermentation alcoolique des vins

Fanny Bordet

► **To cite this version:**

Fanny Bordet. Interactome entre micro-organismes au cours la fermentation alcoolique des vins. Biochimie [q-bio.BM]. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. NNT : 2022UBFCK028 . tel-04085287

HAL Id: tel-04085287

<https://theses.hal.science/tel-04085287v1>

Submitted on 28 Apr 2023

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.



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE
FRANCHE-COMTE**

Préparée A l'Institut Universitaire de la Vigne de Vin, Jules Guyot

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologie

Equipe Vin Aliment Microbiologie et Stress

Ecole doctorale n°554

Ecole doctorale Environnement Santé

Doctorat en Sciences des Aliments

Spécialité Biologie des Organismes

Par

Fanny Bordet

**Interactome entre micro-organismes au cours de la
fermentation alcoolique des vins**

Thèse présentée et soutenue à DIJON, le 20 Avril 2022

Composition du Jury :

M. FRANÇOIS Jean-Marie

Mme CAMARASA Carole

M. BARBE Jean-Christophe

Mme NARDI Tiziana

M. ALEXANDRE Hervé

Mme ROULLIER-GALL Chloé

Mme JULIEN-ORTIZ Anne

Professeur, INSA, Toulouse

Directrice de recherche, INRAe, SPO, Montpellier

Professeur, Bordeaux Sciences Agro, Bordeaux

Chargée de recherche, CREA, Italie

Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

Maître de Conférences, Université de Bourgogne, Dijon

Directrice générale R&D Lallemand oenology, Blagnac

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de thèse

Codirectrice de thèse

Invitée

A mes parents,

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe Vin Aliments Microbiologie et Stress (VALMiS) de l'Unité Mixte de Recherche « Procédés Alimentaires et Microbiologiques » (PAM) à Dijon, dans le cadre d'un dispositif CIFRE financé par la Société Lallemand et l'ANRT. Je remercie les partenaires ; Lallemand Oenology, l'ANRT, le FEDER, pour leur participation à ce projet.

Je souhaite remercier chaleureusement l'ensemble des membres du jury, Dr. Carole Camarasa, Dr. Tiziana Nardi, Pr. Jean-Marie François et Pr. Jean-Christophe Barbe pour avoir accepté d'examiner ces travaux de thèse, pour leurs conseils et la discussion enrichissante lors de la soutenance de thèse.

Je tiens à remercier mes encadrants qui m'ont donné l'opportunité et m'ont fait confiance pour conduire ce projet.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements les plus sincères au Pr. Hervé Alexandre, directeur de thèse mais également responsable de l'équipe pour sa disponibilité et son encadrement. Votre accompagnement et les connaissances que vous m'avez transmises sont précieux.

Un merci tout particulier au Dr. Chloé Roullier-Gall. Merci pour ta disponibilité, ton expertise en métabolomique, tes conseils, ces moments à discuter de choses et d'autres mais surtout pour ton soutien sans faille. Tu as toujours su trouver les mots justes dans les moments de doute, me rassurer et m'accompagner lorsque j'en avais besoin. La thèse n'aurait sans aucun doute été différente sans toi. Je suis heureuse et fière d'avoir été la première doctorante que tu aies encadrée, la première d'une longue lignée je l'espère, les prochains ont de la chance.

Je souhaite sincèrement remercier Anne Julien-Ortiz, responsable R&D Lallemand Oenology. Merci de m'avoir accordé ta confiance pour ce projet. Tu as toujours su suivre le projet et me soutenir, même à distance, en jonglant avec toutes tes responsabilités. C'est toujours un très grand plaisir et enrichissant de travailler avec toi.

Merci à Jordi Ballester, Philippe Schmitt-Kopplin et Régis Gougeon pour leur expertise et leurs conseils avisés dans le cadre de nos collaborations et comités de pilotage.

Une petite pensée au Dr. Stéphanie Weidmann qui m'a fait découvrir la microbiologie en licence, m'a suivi tout au long de mon parcours universitaire et m'a fait confiance en sortie de Master 2. Merci de m'avoir soutenu dans ma candidature pour cette thèse. Je ne serais certainement pas là sans toi.

Un grand merci à toute l'équipe de l'IUVV, Franck, Laurence, et Vanessa pour ton soutien.

Yamina, notre couteau suisse qui m'a permis de toujours travailler dans de bonnes conditions et nous extirpe de toutes les situations délicates, merci pour tout, sans toi, la thèse n'aurait pas eu la même saveur.

Je tiens à remercier tous les doctorants et post-doc pour tous ces moments partagés, qui ne se résumaient pas qu'aux journées au bureau. Un merci tout particulier à Florian, Rémy et Kevin nos #serviettes pour leur aide au quotidien, leur bonne humeur et, il faut l'avouer, leur humour, bien que parfois douteux.

Un merci tout particulier à Thierry et Manon avec qui j'ai démarré et vécu cette folle aventure, on sera passé par toutes les émotions, en espérant continuer l'aventure quelques temps à vos côtés... Manon, mention spéciale, je ne m'attendais pas au « Manny » ou « Fanon », mais cela fini en duo de choc, apparemment indissociable aux yeux des gens, tu es devenue en quelque sorte la petite sœur que je n'ai jamais eu, ravie que l'on t'ait mis sur mon chemin.

La vie ne s'est pas résumée à la vie au laboratoire, alors je n'oublierai pas de remercier mes amis pour tous les moments de décompression, les soirées, les week-ends et vacances improvisés Coco, Mama, Deb, Cam A, Loulou, Ana...

Enfin, un grand merci pour ton soutien au quotidien, 10 ans d'amitié, 10 ans d'études qui finissent de la meilleure des façons, encore plus fou que ce que l'on s'était imaginé, Cam merci pour tout. La dernière ligne droite aura été corcée mais on l'a fait.

Sans oublier les plus importants, sans qui cette thèse n'aurait pas eu la même saveur : mes Parents qui m'ont permis de faire des études et d'arriver jusqu'ici, merci pour votre soutien sans faille et votre présence de chaque instant, je ne pouvais espérer meilleur soutien.

Remerciements	5
Table des matières	7
Communications liées à ce travail	I
Liste des symboles et abréviations	III
Liste des abréviations des métabolites	V
Liste des figures	VI
Liste des équations	XII
Avant-propos	1
Synthèse bibliographique	5
I. De la baie de raisin au vin.....	7
II. L'espèce <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
III. Métabolisme de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
3.1. Besoins nutritionnels en vinification.....	12
3.1.1. Sources carbonées.....	12
3.1.2. Sources azotées.....	12
3.1.3. Eléments minéraux et vitamines	13
3.1.4. Lipides	14
3.1.5. L'oxygène.....	15
3.2. Métabolisme carboné central (MCC).....	15
3.2.1. La glycolyse.....	15
3.2.2. La respiration cellulaire	17
3.2.3. La fermentation alcoolique	20
3.2.4. Voie des pentoses phosphates (VPP).....	21
3.3. Métabolisme des lipides.....	22
3.3.1. Biosynthèse des lipides.....	23
3.3.1.1. Synthèse d'acides gras	23
3.3.1.2. Synthèse des glycérolipides	23
Lipides neutres	23
Phospholipides	24
3.3.1.3. Synthèse des stérols.....	25
3.3.2. Catabolisme des lipides	27
3.4. Métabolisme azoté	28
3.4.1. Catabolisme des acides aminés.....	29
3.4.2. Biosynthèse des acides aminés	29
3.5. Voies de synthèse des arômes fermentaires	31
3.5.1. Synthèse des arômes fermentaires	32
3.5.1.1. Alcools supérieurs.....	33
Transamination.....	33
Décarboxylation.....	33
Réduction des aldéhydes ou oxydation	33
3.5.1.2. Esters.....	35
Esters acétate.....	36
Esters éthyliques d'acides gras.....	37
IV. Interactions au cours de la vinification	38
4.1. Interactions <i>Saccharomyces</i> / non - <i>Saccharomyces</i>	39
4.1.1. De la dominance des non- <i>Saccharomyces</i>	39

4.1.2. ... à celle des <i>Saccharomyces</i>	40
4.2. Interactions <i>Saccharomyces</i> / <i>Saccharomyces</i>	45
4.3. Yeast–Yeast Interactions : Mechanisms, Methodologies and Impact on Composition	47
V. Méthodes analytiques.....	87
5.1. Dynamique de populations.....	87
5.2. Analyse du vin	90
5.2.1. FT-ICR-MS.....	94
5.2.2. GCMS	94
5.2.3. LCMS	95
5.2.4. Avantages / inconvénients : des techniques complémentaires ?.....	96

Objectifs..... 99

Matériels et méthodes..... 105

I. Matériel biologique	107
1.1. Caractérisation des souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	107
1.2. Transformation de la souche <i>S. cerevisiae</i> S3.....	107
1.3. Moût de Chardonnay.....	111
1.4. Jus de raisin standardisé.....	112
II. Conditions de fermentations	112
2.1. Conditions de pré-cultures	112
2.2. Fermentations en Moût de Chardonnay	112
2.2.1. Caractérisation de douze souches de <i>S. cerevisiae</i> (Figure 27)	112
2.2.2. Etude des interactions <i>S. cerevisiae</i> / <i>S. cerevisiae</i> (Figure 28).....	113
2.3. Etude de paramètres de croissance, fermentaire et avantage de fitness de souches de <i>S. cerevisiae</i> en culture pure et co-culture (Figure 29)	114
III. Suivi des fermentations.....	115
3.1. Suivi des cinétiques de croissance par cytométrie en flux	115
3.2. Suivi des cinétiques fermentaires par Spectroscopie Infra-Rouge	116
3.3. Paramètres étudiés.....	117
IV. Microscopie bi-photon	118
V. Analyse des vins.....	118
5.1. Analyse métabolomique.....	118
5.1.1. Spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique et à transformée de Fourier (FT-ICR-MS).....	120
5.1.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol quadripolaire (LC-Q-TOF-MS)	124
5.2. Identification des composés	127
5.3. Dosage des composés volatils.....	128
5.4. Analyse sensorielle.....	130

Chapitre 1 135

Caractérisation Intraspécifique chez *S. cerevisiae*..... 135

Contexte 137

Article..... 138

I. Introduction.....	139
II. Materials and Methods.....	140
2.1. Yeast Strains	140
2.2. Growth and Fermentation Conditions	140
2.3. Monitoring of Biomass Growth	140
2.4. Analytical Methods	141

2.4.1. Oenological Analysis.....	141
2.4.2. Volatilome Analysis	141
2.4.3. Non-Volatile Metabolome Analysis	141
2.5. Descriptive Sensory Analysis	143
III. Results and Discussion.....	143
3.1. Fermentation Kinetics and Yeast Viability	144
3.2. Specific Footprinting of Strains.....	144
3.3. Impact of Strains on the Volatilome	149
3.4. Sensory Impact of Intraspecific Diversity.....	152
IV. Conclusions.....	155
V. References.....	157
VI. Supplementary data.....	160
Conclusions Chapitre 1	167
Chapitre 2	169
Impact de l'intégration d'un gène <i>eGFP</i> chez <i>S. cerevisiae</i> : une approche métabolomique.....	169
Contexte	171
Article.....	172
I. Introduction.....	172
II. Materials and Methods.....	174
2.1. Microbial strains	174
2.2. Constructions of yeast strains labeled with eGFP using CRISPR-Cas9 tool	174
2.3. Fermentation process	175
2.4. Flow cytometry analysis	176
2.4.1. Yeast viability	176
2.4.2. Flow cytometry settings.....	176
2.5. Two photon microscopy.....	176
2.6. Analytical method.....	177
2.6.1. Enological analysis	177
2.6.2. UHPLC-Q-ToF-MS analysis	177
2.7. Results and discussion.....	178
2.7.1. Fluorescence emission of recombinant yeast GFP	178
2.7.2. Growth and fermentation kinetics.....	179
2.8. Metabolomic pattern	181
III. Conclusions.....	184
IV. References.....	185
Conclusions Chapitre 2.....	187
Chapitre 3	189
Interactions entre souches de <i>S. cerevisiae</i>	189
Contexte	191
Etude préliminaire	192
I. Etude des cinétiques de croissance et fermentaire en jus de raisin standardisé	192
II. Analyse du métabolome non volatil.....	196
Article.....	199

I.	Introduction.....	199
II.	Materials and methods	202
2.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains	202
2.2.	Growth conditions.....	202
2.3.	Fermentation conditions.....	202
2.4.	Growth monitoring.....	203
2.5.	Growth kinetics parameters and <i>S. cerevisiae</i> fitness advantage	204
2.6.	Analytical methods.....	204
2.6.1.	Oenological analysis	204
2.6.2.	Volatilome analysis.....	204
2.6.3.	Non-volatile metabolome analysis.....	205
2.7.	Descriptive sensory analysis	206
III.	Results and discussion.....	207
3.1.	Growth and fermentation kinetics parameters	207
3.2.	Volatilome analysis.....	210
3.3.	Sensory analysis.....	213
3.4.	Non volatile metabolome analysis	216
IV.	Conclusion	219
V.	Références.....	221
VI.	Supplementary data.....	225

Conclusions Chapitre 3.....235

Conclusions et perspectives 237

Références bibliographiques 247

Annexes.....272

Articles publiés

Bordet, F.; Joran, A.; Klein, G.; Roullier-Gall, C.; Alexandre, H. Yeast–Yeast Interactions: Mechanisms, Methodologies and Impact on Composition. *Microorganisms* 2020, 8, 600, doi :10.3390/microorganisms8040600.

Bordet, F.; Roullier-Gall, C.; Ballester, J.; Vichi, S.; Quintanilla-Casas, B.; Gougeon, R.D.; Julien-Ortiz, A.; Kopplin, P.S.; Alexandre, H. Different Wines from Different Yeasts? “*Saccharomyces cerevisiae* Intraspecies Differentiation by Metabolomic Signature and Sensory Patterns in Wine.” *Microorganisms* 2021, 9, 2327, doi :10.3390/microorganisms9112327.

Roullier-Gall, C.; **Bordet, F.;** David, V.; Schmitt-Kopplin, P.; Alexandre, H. Yeast Interaction on Chardonnay Wine Composition: Impact of Strain and Inoculation Time. *Food Chemistry* 2021, 131732, doi :10.1016/j.foodchem.2021.131732.

Bordet, F.; Romanet, R.; Eicher, C.; Grandvalet, C. Klein, G.; Gougeon, R.D.; Julien-Ortiz, A.; Roullier-Gall, C.; Alexandre, H. *eGFP* gene integration in *HO*: a metabolomic impact? *Microorganisms* 2022, 10, 781. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040781>

Articles soumis

Bordet, F.; Romanet, R.; Bahut, F.; Ballester, J.; Peña, C.; Ferreira, V.; Gougeon, R.D.; Julien-Ortiz, A.; Roullier-Gall, C.; Alexandre, H. Chardonnay interaction characterization within *Saccharomyces cerevisiae* species, *Food Chemistry*

Communications orales

Bordet, F.; Roullier-Gall, C.; Ballester, J.; Vichi, S.; Gougeon, R.D.; Julien-Ortiz, A.; Kopplin, P.S.; Alexandre, H. (2021). *Saccharomyces cerevisiae* discrimination by metabolomics. *LMO14th*, Strasbourg, France

Bordet, F.; Roullier-Gall, C.; Ballester, J.; Vichi, S.; Gougeon, R.D.; Julien-Ortiz, A.; Kopplin, P.S.; Alexandre, H. (2021). *Saccharomyces cerevisiae* intraspecies differentiation by metabolomic signature and sensory patterns in wine. *MacroWine 2021* (online)

Communications affichées

Bordet, F.; Roullier-Gall, C.; Gougeon, R.D.; Julien-Ortiz, A.; Kopplin, P.S.; Alexandre, H. (2021). *Saccharomyces cerevisiae* discrimination by metabolomics. *International Congress on Yeasts meets International Conference on Yeast Genetic and Molecular Biology (ICY15 meets 30ICYGMB)*, Online

Bordet, F.; Joran, A.; Tran, T(2019). Fermented beverages: A social network for microorganisms. Journée Des Doctorants de l'UMR PAM, Dijon, France

(NH ₄) ₂ HPO ₄	Hydrogénophosphate d'ammonium
ACP	Analyse en Composante Principale
ACP	<i>Acyl Carrier Protein</i>
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AmpR	Ampicilline
ANOVA	<i>Analysis Of Variance</i>
ARN	Acide Ribonucléique
BFP	<i>Blue Fluorescent Protein</i>
CA	<i>Correspondence Analysis</i>
CAH	Classification Ascendante Hiérarchique
CCR	<i>Carbon Catabolism Repression</i>
cFDA	<i>Carboxyfluorescein diacetate</i>
DO	Densité optique
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FA	Fermentation Alcoolique
FCM	<i>Flow Cytometry</i>
FDA	<i>Fluorescein diacetate succinimidyl</i>
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>
FML	Fermentation Malolactique
FSC-H	Forward Scatter -Height
FT-ICR-MS	<i>Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance-Mass Spectrometry</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infra Red</i>
GAAC	<i>General Amino Acid Control</i>
GC	<i>Gaz Chromatography</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
H ₃ PO ₄	Acide phosphorique
HS-SPME-GC-MS	<i>HeadSpace - Solid Phase Micro Extraction -Gaz Chromatography - Mass Spectrometry</i>
IP	Iodure de Propidium
IR	<i>Infra-Red</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
IUVV	Institut Universitaire de la Vigne et du Vin

KanR	Kanamycine
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LiAc	<i>Lithium Acetate</i>
LSA	Levures sèches actives
m/z	Masse/ charge ratio
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
Na ₂ HPO ₄	Hydrogénophosphate de sodium
NCR	<i>Nitrogen Catabolic Repression</i>
OIV	Organisation Internationale de la Vigne et du Vin
PBS	<i>Phosphate Buffer Sodium</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyéthylène Glycol
pH	Potentiel Hydrogène
QC	<i>Quality Control</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
S/N	<i>Signal/ Noise ratio</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SPS	<i>Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p System</i>
SSC-H	<i>Side Scatter-Height</i>
TCA	<i>Tricarboxylic Acid Cycle</i>
uHRMS	<i>ultraHigh Resolution Mass Spectrometry</i>
UPLC-q-TOF-MS	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography-quadrupole-Time Of Flight-Mass Spectrometry</i>
UV	Ultra Violet
v/v	volume par volume
VPP	Voie des Pentoses Phosphate
YAN	<i>Yeast Assimilable Nitrogen</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
μmax	Taux népérien de croissance (h ⁻¹)

Liste des abréviations des métabolites

F1,6-diP	Fructose 1,6-disphosphate
ADP	Adénosine diphosphate
AP	Acide phosphatidique
ATP	Adénosine triphosphate
CDP-DAG	Cytidine diphosphate-diacylglycérol
CO ₂	Dioxyde de carbone
CoA	Coenzyme A
DAG	Diacylglycérol
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
F6P	Fructose-6-phosphate
FAD	Flavine adénine dinucléotide
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
GDP	Guanosine diphosphate
G3P	Glycérol-3-phosphate
GTP	Guanosine triphosphate
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
O ₂	Dioxygène
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEP	Phosphoenolpyruvate
PI	Phosphatidylinositol
Pi	Phosphate
PS	Phosphatidylsérine
TAG	Triacylglycérol

Figure 1 : Schéma des itinéraires de vinification en blanc et rouge.....	7
Figure 2 : Image de <i>S. cerevisiae</i> en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) (Murtey & Ramasamy, 2016).....	9
Figure 3 : Arbre généalogique de 159 souches de <i>S. cerevisiae</i> selon l'étude de leur génome. L'arbre a été déduit à partir de 313 973 SNP (single nucleotide polymorphisms) en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance telle qu'implémentée dans RAXML avec le modèle GTRGAMMA d'évolution des séquences. Les principales lignées ou populations sont indiquées par des ellipses colorées. (Legras et <i>al.</i> , 2018).....	9
Figure 4 : Voie de la glycolyse	16
Figure 5 : Cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques	18
Figure 6 : Voies oxydative et réductrice en condition d'anaérobiose (Camarasa et <i>al.</i> , 2003)	19
Figure 7 : Schéma résumant l'effet Crabtree (Adapté de (Dashko et <i>al.</i> , 2014))	19
Figure 8 : Métabolisme des sucres en conditions fermentaires.....	20
Figure 9 : Fermentation glycéropyruvique.....	21
Figure 10 : Voie des Pentoses Phosphate (VPP).....	22
Figure 11 : Voies de synthèse des glycérolipides (Henry et <i>al.</i> , 2012).....	25
Figure 13 : Schéma de dégradation des acides aminés (d'après Ribéreau-Gayon et <i>al.</i> , 2012)	29
Figure 14 : Voie de biosynthèse des acides aminés (adapté d'après Magasanik and Kaiser, 2002 et Ljungdhal et <i>al.</i> , 2012)	30
Figure 15 : Schéma de formation de l'ensemble des composés volatiles (adapté d'après (Dzialo et <i>al.</i> , 2017; Lambrechts & Pretorius, 2000; Swiegers et <i>al.</i> , 2005)).....	31
Figure 16 : Voie de Ehrlich (adapté d'après Hazelwood et <i>al.</i> , 2008).....	34
Figure 17 : Voie de biosynthèse des esters d'acétate (adapté d'après Swiegers et <i>al.</i> , 2005)	36
Figure 18 : Voie de biosynthèse des esters éthyliques d'acides gras	37
Figure 19 : Schéma illustrant les types d'interactions entre levures rencontrés en vin (Ciani et Comitini., 2015)	39
Figure 20 : Schéma des nouvelles technologies omiques	91
Figure 21 : Représentation schématique de l'espace d'analyse chimique des systèmes impliquant les dimensions de la spectrométrie, de la spectroscopie et des sciences de la séparation avec une résolution croissante. Une résolution ou une orthogonalité supplémentaire est obtenue en spectrométrie de masse avec diverses méthodes d'ionisation, de fragmentation de la masse et/ou de mobilité des ions. Le cube gris au centre couvre les méthodes d'analyse utilisées dans les applications de routine (Schmitt-Kopplin et <i>al.</i> , 2019).....	97
Figure 22 : Représentation schématique des différentes approches utilisées afin de répondre aux différents objectifs des travaux de thèse.....	103

Figure 23 : Plan expérimental développé au cours de la thèse	107
Figure 24 : Schéma du principe de l'outil CRISPR-Cas9 L'ARN guide (sgRNA) dirige l'activité de clivage de Cas9 vers un site génomique spécifique la séquence PAM, où il induit une cassure de l'ADN, permettant l'insertion d'une séquence d'ADN donneur.....	108
Figure 25 : Plasmide pRCC-K (Generoso et <i>al.</i> , 2016)	109
Figure 26 : Plasmide pFA6a-TEF2Pr-GFP-ADH1-NATMX4 (Breslow et al. 2008)	109
Figure 27 : Focus sur la caractérisation de douze souches de <i>S. cerevisiae</i>	113
Figure 28 : Focus sur l'étude des interactions <i>S. cerevisiae</i> / <i>S. cerevisiae</i>	113
Figure 29 : Focus sur l'étude de l'adaptation de <i>S. cerevisiae</i> dans le cadre d'interactions en jus standardisé	114
Figure 30 : Exemples de cytogrammes SSC-H vs FL1-H des conditions co-cultures S8S3 comprenant la souche sauvage (A) ou la souche transformée (B)	116
Figure 31 : Workflow de l'analyse métabolomique non ciblée	Erreur ! Signet non défini.
Figure 32 : Démarche pour extraire les biomarqueurs.....	120
Figure 33 : Spectromètre de masse FT-ICR-MS Solaris (Brucker).....	121
Figure 34 : Évaluation de la répétabilité et stabilité des mesures FT-ICR-MS : (A) répétabilité de la détection m/z pour l'ensemble des échantillons et QC (rouge) sur toute la gamme de m/z (B) projection de la composante de l'ACP au cours du temps (C) Graphique des intensités maximale, moyenne et minimale de l'ensemble des pics détectés pour chacun des 9 QC. (D) Histogramme des coefficients de variation (CV) des intensités des pics détectés pour l'ensemble des QC.	122
Figure 35 : Visualisation d'une réduction des données à chaque étape du pré-traitement ...	123
Figure 36 : Exemple de diagramme de van Krevelen (A) indiquant la position du glucose et (B) illustrant les zones ou les principales familles chimiques de composés sont retrouvées.	124
Figure 37 : Spectromètre de masse UPLC-Q-TOF-MS : UHPLC Dionex Ultimate 3000 (ThermoFisher) couplée au spectromètre de masse Maxis plus MS ESI-Q-TOF (Bruker)...	125
Figure 38 : Séquence d'analyse UPLC-Q-TOF-MS garantissant la qualité analytique.....	126
Figure 39 : Principe de fragmentation des ions en spectrométrie MS/MS	127
Figure 40 : Résumé des différents niveaux d'identification des composés en spectrométrie de masse à haute ou ultra-haute résolution (adapté d'après Schymanski et <i>al.</i> , 2015).....	128
Figure 41 : Fiche d'évaluation des vins selon la méthode de la fréquence de citation	132
Figure 42 : Interface d'un bulletin de réponse pour la séance de sélection	134
Figure 43 : Interface d'un bulletin de réponse pour la séance d'évaluation	134
Figure 1.1: (A) Principal-component analysis of twelve <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains based on FT-ICR-MS data using direct methanol dilution. ANOVA ($p < 0.05$) was used to extract specific markers for each of the twelve strains: S2, S3 and S4 are represented as examples. For each strain, H/C vs O/C van Krevelen diagrams (B), histogram proportions that show their elemental compositions (C), and a pie chart (D) representing the distribution of these	

markers by hypothetical families of common wine compounds are presented. Bubble sizes indicate relative intensities of corresponding masses. Color code: CHO, blue; CHON, orange; CHONS, red; CHOS, green..... 145

Figure 1.2: H/C vs m/z van Krevelen diagrams combined with intensity vs m/z diagrams coupled to histogram proportions of the elemental formula compositions exhibit specific strain markers significantly less (B) and more (A) intense in each fermentation. Bubble sizes indicate relative intensities of corresponding masses. Color code : CHO, blue; CHON, orange; CHONS, red; CHOS, green. The pie chart represents the distribution of these markers by hypothetical families of common wine compounds. 148

Figure 1.3: Biplot of PCA (Dim1 vs Dim2) analysis applied to significantly different volatile compounds found in the twelve fermentations carried out by the different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Colored samples represent different classes obtained from HCA. 150

Figure 1.4: Heat map of volatile compounds produced by the different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Columns correspond to volatile compounds that presented significant differences between twelve strains. Colored samples represent different class obtained from HCA. 151

Figure 1.5: Biplot of the correspondence analysis of the general description of the twelve wines. Colors indicate the clusters obtained by HCA (using Ward’s criterion) on the two first CA dimensions. 153

Figure S1.1 : (A) Time series plot of the first principal component (t(1) vs. sample run order) (B) Plot representing the maximum, mean and minimum peak intensity for each of the 9 QCs. (C) Histogram of all coefficient of variation values computed from the peak intensities from all the detected molecular compositions in the FT-ICR-MS data. (D) Extracted ion chromatograms of m/z 149.00917 in 9 sequential QCs samples. 160

Figure S1.2 : Compounds common to all samples detected after methanol dilution. H/C vs O/C Van Krevelen diagrams. histogram proportion showing their elemental compositions. H/C vs m/z Van Krevelen diagrams combined with intensity vs m/z diagrams coupled to histograms proportions of the elemental formula compositions. and pie chart representing the distribution of these markers by hypothetical families of common wine compounds adapted from Rivas and Ubach et al.. 2018 [23]. Bubble sizes indicate relative intensities of corresponding masses. Colour code : CHO. blue; CHON. orange; CHONS. red; CHOS. green. 162

Figure S1.3 : Footprinting of twelve *Saccharomyces cerevisiae* strains based on FT-ICR-MS data using direct methanol dilution. ANOVA (p<0.05) was used to extract specific markers for each of the twelve strains. For each strain. H/C vs O/C Van Krevelen diagrams (B). histogram proportion (C) that show their elemental compositions and pie chart (D) representing the distribution of these markers by hypothetical families of common wine compounds adapted from Rivas and Ubach et al.. 2018 [23]. Bubble sizes indicate relative intensities of corresponding masses. Color code : CHO. blue; CHON. orange; CHONS. red; CHOS. Green 163

Figure S1.4 : H/C vs m/z Van Krevelen diagrams combined with intensity vs m/z diagrams coupled to histograms proportion of the elemental formula compositions exhibits specific strains markers significantly less and more intense in each fermentation. Bubble sizes indicate

relative intensities of corresponding masses. Color code : CHO. blue; CHON. orange; CHONS. red; CHOS. green. The pie chart represents the distribution of these markers by hypothetical families of common wine compounds adapted from Rivas and Ubach et *al.*. 2018 [23] **164**

Figure S1.5 : Number of biomarkers that could be associated with the different metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* using MassTriX and Kegg..... **165**

Figure 2.1: Two-photon microscopy observation of (A) the modified strain S3GFP and (B) the wild-type strain S3. The images A2 and B2 were obtained with channel FF01-492/SP (400–492 nm) and A3 and B3 with channel FF03-525/50 (500–550 nm). The images A1 and B1 provided were obtained by merging these two detection channels. **179**

Figure 2.2: Fermentation profile comparison in Chardonnay must. Cell viability and sugar consumption were monitored for the *Saccharomyces cerevisiae* wild-type strain S3 (in grey) and the recombinant strain S3GFP (in green). Solid curves represent viable cell populations and dotted curves represent sugar concentrations. For each strain, the experiments were performed in triplicate and the error bars represent the confidence interval. **180**

Figure 2.3: A : Heatmap based on the 214 significantly different annotated compounds for S3 and S3GFP in Chardonnay must. B1 and B2 represent the van Krevelen diagrams for the compounds which are significantly more present in S3 and S3GFP (in red on the Heatmap), respectively. C1 and C2 represent retention time versus mass (Da) for the compounds significantly more present in S3 and S3GFP, respectively. The area of bubbles corresponds to the square root of detected area divided by 10..... **182**

Figure 3.1 : Taux maximal de croissance (μ_{max}) en fonction des cultures pures ou mixtes de *S. cerevisiae* pour chaque modalité : S2S3, S4S3 et S8S3. μ_{max} a été exprimé en h^{-1} . Les valeurs correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques et les barres d'erreur représentent l'écart-type. L'analyse statistique a été effectuée entre S3 et S3GFP pour chaque modalité et entre la culture pure et la co-culture pour chaque souche impliquée dans chaque modalité (test t, valeur $p < 0,05$) (NS : non significatif). **193**

Figure 3.2 : (A) Diagrammes de Venn des co-cultures et cultures pures correspondantes pour chaque modalité S2S3, S4S3 et S8S3. (B) Les biomarqueurs des co-cultures et cultures pures correspondantes sont mis en évidence dans des diagrammes de van Krevelen et des diagrammes circulaires représentant la composition des formules moléculaires. La taille des bulles indique les intensités relatives des pics correspondants dans les spectres **197**

Figure 3.3 : Experimental design and sample generation for the S4S3 modality **203**

Figure 3.4: Maximum growth rate of each *S. cerevisiae* strain population (μ_{max}), in Chardonnay, as a function of (A) S3GFP in pure culture or in each coculture for each modality : S2S3 (Orange), S4S3(Blue) and S8S3(Green) and (B) S2, S4 and S8 in pure culture and in each coculture for each modality : S2S3 (Orange), S4S3(Blue) and S8S3(Green). μ_{max} was expressed in h^{-1} . Values correspond to the average of three biological replicates and error bars represent the standard deviation. Statistical analysis was performed between both pure culture and coculture for each strain involved (t-test, p -value < 0.05) (NS: non significant)..... **207**

Figure 3.5: Volatilome analysis (A) PCA of data of Chardonnay wines from pure cultures and coculture for each modality S2S3 (orange), S4S3 (blue), S8S3 (green). (B) HCA representing extracted significantly different compounds by ANOVA and a post-hoc Tukey HSD test (p -value <0.05) in pure cultures and cocultures..... **211**

Figure 3.6: (A) Sensory profiles of Chardonnay wines from pure cultures, corresponding cocultures and post-alcoholic fermentation mixes for each modality S2S3 (orange), S4S3 (blue) and S8S3 (green). (B) Histogram of score intensity for attributes showing significant differences (Newman Keuls test, $p\text{-value} \leq 0.05$) between the four wines studied by modality. For modality S4S3 no attribute was significantly different between the different conditions. **215**

Figure 3.7: UPLC-Q-TOF-MS data (A) PCA of data of pure cultures, coculture and post-alcoholic single fermentation Chardonnay wine mixes for each modality S2S3 (orange), S4S3 (blue), S8S3 (green). (B) HCA representing extracted significantly different compounds, assessed by t-test ($p\text{-value} < 0.05$), in pure cultures, cocultures and mixes. (C) Histogram proportions of elemental compositions of significantly more intense biomarkers of each coculture. **216**

Figure S3.1 : (A) Time series plot of the first principal component (t(1) vs. sample run order). QCs are highlighted in orange. (B) Plot representing the maximum, the mean and the minimum of peak intensity for each of QCs. (C) Histogram of all coefficient of variation values computed from the peak intensities from all detected molecular compositions in the FT-ICR-MS data. **225**

Figure S3.2 : UPLC-Q-TOF-MS data, PCA score plot of all samples, QCs are highlighted in red. **225**

Figure S3.3 : Ballot used for the intensity notation on scale (Redjade software)..... **226**

Figure S3.5 : Biplot of PCA of Chardonnay wines from pure cultures, corresponding cocultures and post-alcoholic fermentation mixes for each modality (S2S3 (orange), S4S3 (blue), S8S3 (green))..... **230**

Annexe 1: Diversity of methodologies and results in yeast interaction experiments..... **272**

Tableau 1 : Exemples de travaux révélant une diversité intraspécifique chez <i>S. cerevisiae</i> ..	11
Tableau 2 : Tableau listant les principaux composés volatiles fermentaires, leur seuil de perception et leur descripteur associée en vin.....	32
Tableau 3 : Intermédiaires de la voie d'Ehrlich (d'après Hazelwood et al., 2008 et Dzialo et al., 2017)	35
Tableau 4 : Différents types d'interactions et leurs effets sur les populations en présence (0 : absence d'effet, - : effets délétères sur la population, + effets bénéfiques pour la population)	38
Table 1. Diversity of methodologies and results in <i>S. cerevisiae</i> / <i>Lachancea thermotolerans</i> interaction experiments	51
Tableau 5 : Avantages et inconvénients des différentes approches analytiques (d'après Pinu, 2018).....	91
Tableau 6 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de spectrométrie de masse	96
Tableau 7 : Amorces utilisées pour la transformation de la souche de <i>S. cerevisiae</i> et la vérification de transformation. La séquence de l'ARNg ciblant le gène HO a été soulignée pour l'ARNg-oligotarget1-HO. Les queues flottantes des amorces Fluo-F-HO et Fluo-R-HO permettant la recombinaison ont également été soulignées.	111
Tableau 8 : Paramètres physicochimiques du moût de Chardonnay 2018	111
Tableau 9 : Description de la composition levurienne initiale des fermentations menées. La proportion de chacune des souches de <i>S. cerevisiae</i> est indiquée pour chaque condition étudiée. Chaque couleur symbolise une modalité : S2S3 (Orange), S4S3 (Bleu), S8S3 (Vert).....	114
Tableau 10 : Proportion des différents vins issus d'assemblages	131
Table 1.1: Table of extracted, annotated, and identified metabolites according to wine fermented by each strain of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S1 to S12).	147
Table S1.2 : Cell viability and fermentation parameters for the 12 strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S1 to S12)	162
Table S1.3 : Table of extracted. annotated. and identified metabolites according to wine fermented by each strain of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S1 to S12). Levels of annotations were derived from Viant et al.. 2017 [26].....	165
Table S1.4 : Table of concentrations of each volatile compound with standard deviation and letter of significance	166
Table 2.1: Primers used in this study. sgRNA sequences targeting the HO gene have been underlined for gRNA-oligotarget1-HO. Floating tails of Fluo-F-HO and Fluo-R-HO primers enabling recombination have been underlined.	175
Table 2.2: Growth and fermentation kinetics parameters for strains S3 and S3GFP in Chardonnay must.....	180

Tableau 3.1 : Paramètres (A) de cinétique de croissance et (B) de cinétique fermentaire mesurés pour chaque souche dans chacune des trois modalités (S2S3, S4S3 et S8S3) en moût de Chardonnay.....	195
Table 3.2 : Description of each condition with the proportion of each strain. Orange, blue and green colors correspond to S2S3, S4S3 and S8S3 modalities, respectively.	203
Table 3.3: (A) Growth and (B) fermentative kinetics parameters measured for each strain in the three modalities (S2S3, S4S3 and S8S3) in Chardonnay.	208
Table 3.4: Table of extracted, annotated and identified metabolites of Chardonnay wine fermented by each single strain, coculture or strains mixed for each modality S2S3 (orange), S4S3 (blue), S8S3 (green).	218
Table S3.1 : Table of concentrations of each volatile compound with standard deviation (Nd : no detected)	228
Table S3.2 : Table of concentrations of each volatile compound associated to an OAV > 1 with standard deviation and letter (S2S3 (orange), S4S3 (blue), S8S3 (green)).....	229
Table S3.3 : Annoation of fragmented masses.....	230

* Ce travail de thèse contient des parties rédigées en anglais sous forme d'article scientifique. Par souci de référencement, les légendes des tableaux dans ces parties rédigées en anglais apparaissent avec la dénomination « Table ».

Liste des équations

Équation 1 : Equation globale de la fermentation alcoolique d'après Gay-Lussac 1815.....	8
Équation 2 : Equation pour déterminer le nombre de génération pour atteindre la population maximale	117

AVANT-PROPOS

Après avoir été inscrit en 2010 comme patrimoine immatériel de l'humanité à l'Unesco, le vin est désormais reconnu comme patrimoine de la culture française. La France est aujourd'hui le deuxième pays consommateur de vin dans le monde après les USA, avec 26 millions d'hectolitres consommés en 2020 (OIV, 2021).

Dans un contexte d'évolution perpétuelle des exigences du consommateur, la qualité du produit fini se retrouve au cœur des préoccupations de la filière vitivinicole. Elle peut être définie selon divers aspects dont le principal reste l'appréciation gustative et olfactive des consommateurs. Cet aspect hédonique est dépendant de nombreux paramètres, allant du sol aux techniques de vinification, en passant par la vigne. Néanmoins, les micro-organismes jouent un rôle clé dans l'élaboration du vin. Ils affectent à la fois la qualité du raisin avant la récolte et participent notamment aux processus fermentaires. Menée par des levures, la fermentation alcoolique, qui correspond à la bioconversion des sucres en éthanol, est également associée à la production de centaines de composés secondaires qui contribuent à la subtilité et à l'individualité du caractère du vin. Ces composés aromatiques fermentaires identifiés et recherchés pour leur impact sur le profil sensoriel sont majoritairement synthétisés par les levures qui valorisent également les arômes variétaux de différents cépages.

Afin d'assurer une certaine pérennité de la qualité des vins à travers les millésimes, de plus en plus de professionnels du secteur ont recours à l'utilisation de starters sous forme de levure sèche active (LSA). En 2021, 393 starters étaient commercialisés sur le marché œnologique. Ces levures sont sélectionnées pour leur capacité fermentaire, la protection de la matrice envers d'éventuels développements de flores d'altération liées à des dérives organoleptiques mais également pour leur orientation métabolique à impact aromatique. *Saccharomyces cerevisiae* se présente donc comme un parfait candidat de par ses capacités à tolérer les conditions environnementales strictes parmi lesquelles une pression due à l'importante concentration en sucres du moût, un taux croissant d'éthanol de même qu'une faible disponibilité en oxygène et nutriments. Ainsi, la majorité de ces starters aujourd'hui commercialisés sont des souches de *S. cerevisiae*.

Au sein même de cette espèce, il a été montré, une importante diversité génétique et phénotypique qui conduit à des vins présentant des profils chimiques et aromatiques différents.

Aussi, dans ce contexte, nous avons décidé d'explorer les éventuelles interactions intervenant lors de la mise en présence de deux souches de *S. cerevisiae* et leur impact sur la composition des vins et de leur profil aromatique selon une approche intégrative. En définissant

et en caractérisant ces phénomènes d'interactions, il pourrait être envisagé une modulation dirigée du profil chimique et aromatique des vins.

Ce manuscrit débute par une synthèse bibliographique qui permettra de mettre en perspectives les travaux de thèse et de contextualiser nos objectifs. Les résultats sont structurés en trois chapitres, chacun d'eux développé autour d'un article scientifique et donnent lieu à des conclusions perspectives.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. De la baie de raisin au vin

La vinification correspond à l'ensemble des étapes nécessaires à la transformation du raisin en vin. Ces étapes peuvent différer et être adaptées selon le type de vin qu'il soit blanc, rouge ou rosé mais également selon le millésime, le cépage, le terroir, et enfin selon les caractéristiques souhaitées du produit. En effet, le process est adapté selon la volonté du vinificateur, cependant il existe des étapes communes à tous les itinéraires de vinification. Parmi ces dernières, on retrouve la vendange, le sulfitage, la cuvaision, la fermentation alcoolique (FA), la fermentation malolactique (FML) et le pressurage (Figure 1).

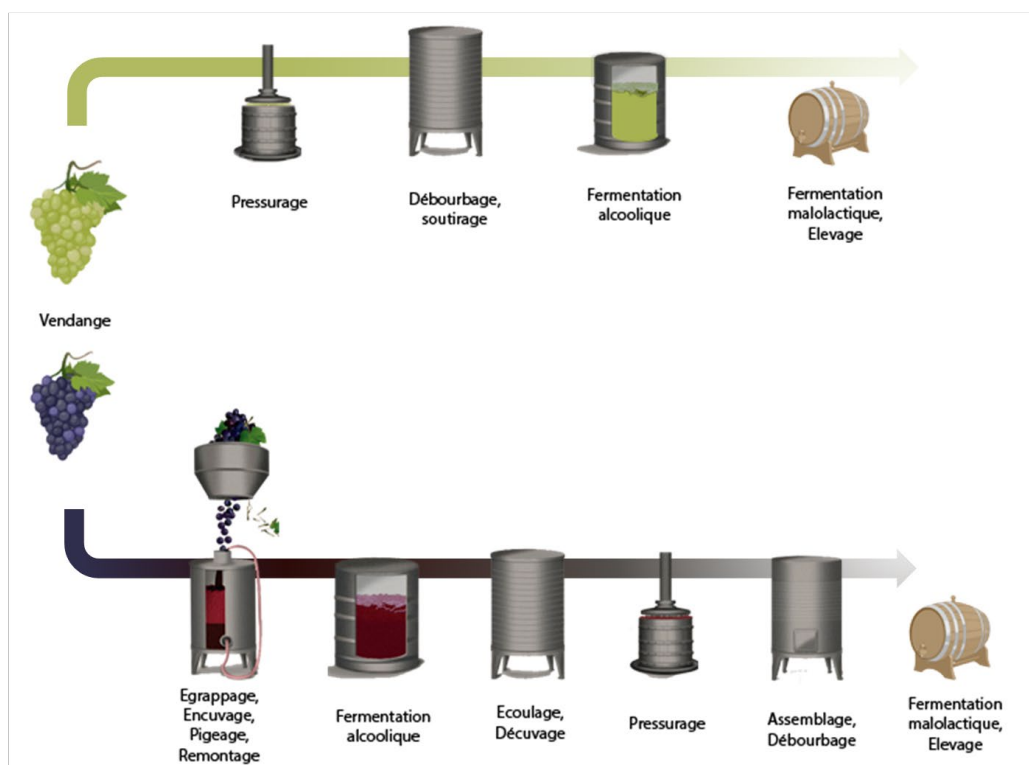
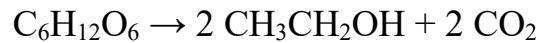


Figure 1 : Schéma des itinéraires de vinification en blanc et rouge

Le vin issu de l'ensemble de ces étapes est défini par l'OIV 1973 comme étant une « boisson résultant exclusivement de la fermentation alcoolique complète ou partielle du raisin frais, foulé ou du moût de raisin » dont l'étape clé est la fermentation alcoolique (Ribéreau-Gayon, 1991). Au cours de cet exposé, un focus sur cette dernière sera réalisé.

La fermentation alcoolique désigne la conversion biologique des sucres fermentescibles, essentiellement le glucose et le fructose en éthanol et gaz carbonique selon l'équation globale suivante établie par Joseph-Louis Gay-Lussac en 1815 (Equation 1).



Équation 1 : Equation globale de la fermentation alcoolique d'après Gay-Lussac 1815.

Cette dernière donne lieu à la production d'autres sous-produits tels que des acides organiques, le glycérol ainsi que de la biomasse microbienne. La fermentation alcoolique peut être initiée de manière spontanée et menée par les levures présentes naturellement sur la baie de raisin ou encore sur le matériel viti-vinicole du chai (Henschke, 1993). Les levures dominantes trouvées sur la baie de raisin sont majoritairement des levures non-*Saccharomyces* qui constituent un vaste groupe de micro-organismes n'appartenant pas au genre *Saccharomyces*. Parmi celui-ci, sont identifiés les genres, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* ou encore *Pichia* (Barata et al., 2012; Fleet, 2003). Celles-ci vont être retrouvées durant les premiers stades de l'élaboration du vin. *Saccharomyces cerevisiae*, espèce minoritaire voire indétectable (Combina et al., 2005; Raspor et al., 2006) sur baie malgré quelques exceptions (Beltran et al., 2002; Querol et al., 1992) devient majoritaire lors de la fermentation alcoolique. Du fait de sa tolérance aux conditions drastiques que le milieu implique, elle est décrite comme l'espèce dominante lors de la fermentation alcoolique. Parmi ces conditions particulièrement strictes, il est retrouvé la pression osmotique induite par la grande concentration en sucres dans le moût (200-260 g.l⁻¹) puis un fort taux d'éthanol (>5 %) (Constantí et al., 1997), mais également des carences en O₂ (Fleet, 2003), ou en nutriments tel que l'azote (Gutiérrez et al., 1999; Povhe Jemec et al., 2001).

II. L'espèce *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *S. cerevisiae* est décrite pour avoir une place clé dans les processus fermentaires depuis de très nombreuses années. En 1837, Meyen attribue le nom de *S. cerevisiae* à de petits organismes vivants unicellulaires découverts par Schwann et Kützing, réalisant la fermentation alcoolique. Cependant, c'est Louis Pasteur en 1845 qui découvrit la présence naturelle de cette espèce de micro-organismes entraînant la fermentation spontanée des sucres en éthanol et dioxyde de carbone (CO₂). *S. cerevisiae* est un organisme unicellulaire eucaryote faisant partie du règne des fungi. Au sein du genre *Saccharomyces*, il existe 13 espèces (ITIS : Integrated Taxonomic Information System) dont *cerevisiae*.

Premier organisme eucaryote dont le génome a été séquencé avec 6000 gènes identifiés (Goffeau, 1996), *S. cerevisiae* peut mesurer de 4 à 15 µm et présente une forme ovoïde à ronde présentant de multiples cicatrices de bourgeonnement (Figure 2).

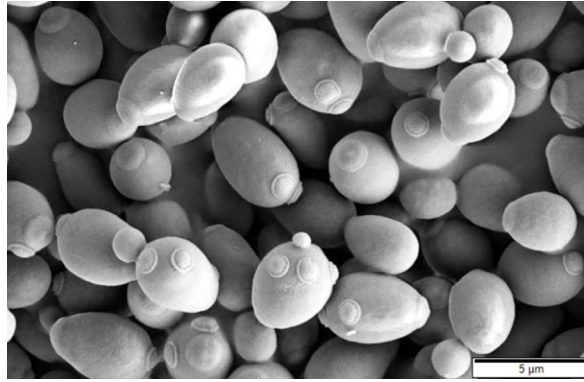


Figure 2 : Image de *S. cerevisiae* en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) (Murtey & Ramasamy, 2016)

Cet organisme hétérotrophe aérobie-anaérobie facultative est fortement impliqué dans de nombreux procédés biotechnologiques, et plus particulièrement fermentaires depuis des millénaires pour des applications traditionnelles, mais également comme usine cellulaire pour la production de métabolites d'intérêt utilisés dans divers domaines tels que la pétrochimie (biocarburants), l'agroalimentaire (arômes), ou la pharmacologie (insuline, vaccins). Cette espèce est connue pour être présente dans de nombreux environnements qu'ils soient naturels ou non. Parmi les niches écologiques de *S. cerevisiae*, la niche œnologique apparaît comme très spécifique en incluant des levures qui présentent des caractéristiques clés telle que la production rapide d'éthanol à partir d'une grande concentration de sucres fermentescibles, la production rapide de biomasse (Camarasa et al., 2011) ou encore la capacité à capter les acides aminés exogènes (Brice et al., 2018). Du fait de leurs caractéristiques communes, différentes études ont montré que ces dernières pourraient avoir une origine unique (Legras et al., 2007; Schacherer et al., 2009)(Figure 3).

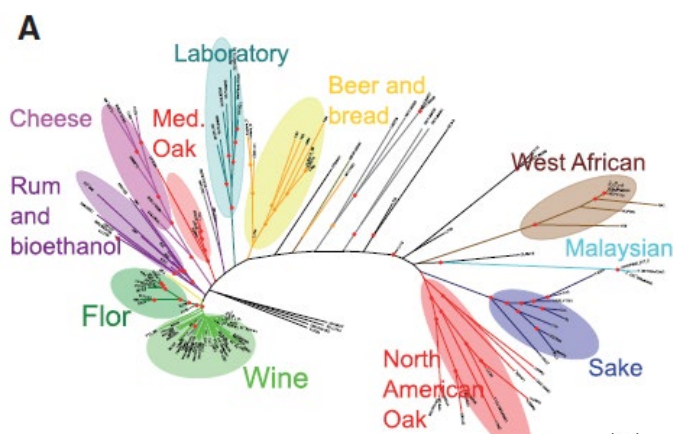


Figure 3 : Arbre généalogique de 159 souches de *S. cerevisiae* selon l'étude de leur génome. L'arbre a été déduit à partir de 313 973 SNP (single nucleotide polymorphisms) en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance telle qu'implémentée dans RAXML avec le modèle GTRGAMMA d'évolution des séquences. Les principales lignées ou populations sont indiquées par des ellipses colorées. (Legras et al., 2018)

En outre, *S. cerevisiae* arbore une importante diversité phénotypique et génétique au sein même de cette niche œnologique. Bien que les travaux se soient focalisés sur des études bien spécifiques, tous décrivent cette importante diversité intraspécifique (Tableau 1). Ainsi, les études visant à décrire la diversité intraspécifique à l'échelle du métabolisme de *S. cerevisiae* s'accordent à comparer plusieurs souches selon une matrice définie. Cette approche a permis l'exploration du métabolisme de souches de *S. cerevisiae*, suivant les sources nutritives disponibles. La plupart des études se sont intéressées à l'importance des ressources azotées, rapportant d'importantes variations au sein de l'espèce, au travers de leur besoins (Brice et al., 2014), de la capacité des souches de *S. cerevisiae* à les assimiler (Crépin et al., 2012), de leur profil de consommation (Gutiérrez et al., 2013) ou encore selon la perspective des préférences pour ces ressources (Brice et al., 2018; Jiranek et al., 1995).

Ces variations phénotypiques quant à l'utilisation des sources azotées ont également été associées à des variations de synthèse des composés volatiles (Hu et al., 2022; Pereira et al., 2021; Scott et al., 2021).

Au travers de ces dernières la synthèse de composés volatiles s'est révélée souche dépendante, confirmant une importante diversité phénotypique déjà observée (Barrajón et al., 2011; Blanco, Mirás-Avalos, Pereira, et al., 2013; Patel & Shibamoto, 2002; Pretorius & Bauer, 2002; Romano, 2003; Rossouw et al., 2008). Ces observations ont également été réalisées dans le cadre de travaux visant à comparer des souches commerciales et des souches dites indigènes ; selon leur impact sur des matrices naturelles spécifiques, issues de différents cépages tels que Treixadura (Blanco, Mirás-Avalos, Suárez, et al., 2013), Vinsanto (Domizio et al., 2007), Merlot (Callejon et al., 2010) ou encore Godello et Albarino (Blanco, Mirás-Avalos, Pereira, et al., 2013).

Aussi, cette variabilité phénotypique est associée à une variabilité génétique (Tofalo et al., 2013, 2014). Bon nombre d'études se sont aussi attachées à décrire l'expression génique de *S. cerevisiae* dans des conditions définies, particulièrement stressantes, dont la carence en azote dans le milieu (Barbosa et al., 2015; Mendes-Ferreira et al., 2009; Pizarro et al., 2008), la grande concentration en sucres (Landolfo et al., 2008), ou la carence en acides gras (Zara et al., 2019).

Tableau 1 : Exemples de travaux révélant une diversité intraspécifique chez *S. cerevisiae*

Nombre de souches	Origine des souches (I: indigène / C: commerciale)	Matrice d'étude	Objectifs de l'étude	Stratégie d'études						Diversité intraspécifique indentifiée		Références		
				Croissance	Capacités fermentaires	Paramètres oenologiques	Quantification composés d'intérêt	Quantification VOC	Métabolomique	Transcriptomique	Génomique		Analyse sensorielle	Génétique
82	I	Moût naturel (Grillo)	Amélioration de la qualité des vins de base de Grillo	x	x		x						Synthèse et résistance à l'éthanol et les sulfites	Alfonzo <i>et al.</i> , 2020
3	I (2); C (1)	Moût synthétique	Évaluation de l'impact de l'azote assimilable sur la production de composés volatiles	x	x		x	x					Impact source azotée Synthèse VOC	Barbosa <i>et al.</i> , 2012
3	C	Moût synthétique	Réponses des levures à la disponibilité de l'azote pendant la fermentation							x			Expression génique en réponse aux concentrations en sources azotées	Barbosa <i>et al.</i> , 2015
5	I	Moût naturel (Treixadura)	Évaluation de l'impact de souches indigènes sur les caractéristiques des vins de Treixadura	x	x								Synthèse VOC Profil sensoriel	Blanco <i>et al.</i> , 2013
3	I (2); C (1)	Moût naturel (Godello, Albari)	Évaluation de l'impact de souches indigènes sur les caractéristiques des vins de Godello, Albari	x	x			x			x		Capacités fermentaires Synthèse VOC Profil sensoriel	Blanco <i>et al.</i> , 2013
2	I	178 Moûts naturels Français	Évaluation de l'importance de la composition du moût sur le déroulé de la fermentation	x	x		x						Capacités fermentaires	Blateyron <i>et al.</i> , 2011
130	I	Moût naturel (Nero d'Avola)	Isolément de souches indigènes pour leur importance dans la typicité du vin régional	x	x			x					Synthèse VOC Capacité d'implantation	Capece <i>et al.</i> , 2010
2	C	Moût synthétique	Évaluation de l'impact de l'azote assimilable sur la production de composés volatiles	x	x			x			x		Synthèse VOC Profil sensoriel	Carrau <i>et al.</i> , 2008
20		Moût synthétique Moûts naturels	Amélioration des processus de vinification	x	x								Capacités fermentaires Synthèse VOC	Colombié <i>et al.</i> , 2005
6	I (3); C (3)	Moût synthétique	Évaluation de l'importance de la disponibilité en azote dans les différences intraspécifiques et compréhension des mécanismes sous-jacents	x	x	x	x						Croissance Consommation de l'azote Vitesse d'assimilation de l'azote	Crépin <i>et al.</i> , 2014
9	I	Milieu culture	Évaluation de la sensibilité au cuivre des souches							x			Expression génique	Fay <i>et al.</i> , 2004
4	L	Moût synthétique	Évaluation de l'assimilation des sources d'azote	x			x						Croissance Accumulation azote intracellulaire	Güttierrez <i>et al.</i> , 2016
4	C	Moût naturel (Chardonnay)	Impact de souches commerciales sur la qualité du vin de Chardonnay	x		x	x				x		Synthèse VOC Profil sensoriel	Herjavec <i>et al.</i> , 2003
3	C	Moût synthétique	Évaluation de l'impact de l'azote assimilable sur la production de composés volatiles	x		x	x						Synthèse acides organiques et diacétyl	Hernandez-Orte <i>et al.</i> , 2006
9	C	Moût synthétique	Évaluation des besoins en acides aminés de différentes souches	x			x						Besoins en azote Phénotype killer	Jiraneck <i>et al.</i> , 1995
34	I (32); C (2)	Moût synthétique Moût naturel (Malbec)	Développement d'un starter à partir d'une souche indigène isolée	x			x	x					Capacités fermentaires Synthèse VOC	Lopes <i>et al.</i> , 2007
2	I (1); C (1)	Moût naturel (Merseguera)	Comparaison de souche commerciale et indigène à différentes températures de fermentation							x	x		Performances fermentaires Différences métabolomiques	Minebois <i>et al.</i> , 2021
7	C	Moût synthétique	Évaluation de l'impact de différents facteurs environnementaux : azote, N ₂ , lipides et température sur les fermentations	x	x			x					Réponse aux conditions environnementales	Rollero <i>et al.</i> , 2015
5	C	Moût synthétique	Impact de la régulation transcriptionnelle sur l'expression du métabolisme et l'adaptation des souches au milieu					x	x				Expression génique	Rossouw <i>et al.</i> , 2012
28	C	Moût synthétique	Évaluation des besoins en azote de souches industrielles	x	x						x		Besoins en azote Vitesse de consommation des sucres	Su <i>et al.</i> , 2021
395	I	Moût naturel (Montepulciano d'Abruzzo)	Évaluation de la diversité des souches isolées du vin Montepulciano d'Abruzzo pour créer une banque de souches liées au terroir	x							x		Identification génique	Tofalo <i>et al.</i> , 2014
2	C	Moût naturel (Chardonnay)	Évaluation de la production de composés volatiles par des souches présentant des besoins en azote différents				x	x					Consommation azote Synthèse VOC	Torrea <i>et al.</i> , 2003
34	I	Moût naturel (Susumaniello)	Isolément de souches indigènes pour leur importance dans la typicité du vin régional	x	x			x					Capacités fermentaires Synthèse VOC	Trsitezza <i>et al.</i> , 2014

Dans une étude plus large, en 2011, Camarasa et collaborateurs, ont pu montrer qu'au sein même de la niche œnologique il existait des disparités entre les souches isolées des vignobles et les souches commerciales. En effet, ces dernières présentaient des durées de fermentation plus courtes mais également une production de métabolites comme l'acétate ou l'alcool isoamylique très différente. Cette différence phénotypique est décrite comme la conséquence de la sélection humaine des souches commerciales pour leur caractéristiques fermentaires et métaboliques. De plus, il a été mis en évidence au sein de l'espèce *S. cerevisiae* que la variabilité phénotypique observée est associée aux différences d'adaptation métabolique des souches, en réponse à des conditions environnementales stressantes telles que la pression osmotique, l'éthanol, ou encore la limitation en nutriments. Cette adaptation métabolique pourrait être en partie liée à des transferts de gènes horizontaux entre espèces ou au sein même de l'espèce conférant des avantages importants face aux conditions environnementales et nutritionnelles du moût (Marsit et *al.*, 2015).

III. Métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae*

3.1. Besoins nutritionnels en vinification

La levure *S. cerevisiae* requière diverses sources nutritionnelles présentes dans le moût afin de se développer et de réaliser la fermentation alcoolique.

3.1.1. Sources carbonées

Les sources carbonées nécessaires à son métabolisme sont essentiellement représentées par les sucres présents dans le moût de raisin. En effet, 99% des moûts de raisin sont majoritairement composés de glucose et fructose à une concentration comprise entre 190 à 255 g.l⁻¹ avec un ratio de 50/50. La concentration des sucres au sein du moût est impliquée dans la modulation de la croissance levurienne et par conséquent dans la vitesse de dégradation des sucres par ces dernières.

3.1.2. Sources azotées

L'azote est décrit comme un constituant du moût essentiel pour la levure bien que les besoins soient dépendants de la souche de levure (Julien et *al.*, 2000). Les moûts présentent des concentrations en azote pouvant être comprises entre 60 et 400 mg.l⁻¹ selon le cépage, la localisation géographique, les conditions climatiques ou encore l'état sanitaire de la vigne (Bell & Henschke, 2005; Spayd et *al.*, 1994). L'azote se retrouve dans le moût de raisin sous différentes formes dont les majoritaires sont les acides aminés, les peptides ou encore les ions

ammoniums (Ribéreau-Gayon, 1999). Ce dernier se révèle être d'intérêt majeur en participant à la synthèse d'acides aminés et de protéines. Cette source azotée exogène est également impliquée dans le métabolisme de synthèse de composés aromatiques (Swiegers *et al.*, 2005). La concentration en azote assimilable peut devenir un élément limitant pour la croissance levurienne ainsi que le rendement fermentaire. Aussi, une carence en azote peut avoir pour conséquence, des fermentations languissantes (Alexandre & Charpentier, 1998). Des apports en sources azotées (acides aminés et ions ammonium) sont parfois nécessaires pour palier à ces carences. Cependant, une addition maîtrisée est essentielle et dépendante de la teneur en sucres, des conditions de fermentation et des souches de levures impliquées. Bien que cette carence soit décrite lorsque la concentration en azote assimilable se retrouve inférieure à 140 mg.l⁻¹ (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012), les souches présentent des exigences différentes face aux ressources azotées. En 2000, Julien et collaborateurs ont établi une classification des souches de *S. cerevisiae* selon leurs besoins en azote (High or Low requiring strains) (Julien *et al.*, 2000). De plus, des études se sont attachées à définir et classer les sources préférentielles en azote de souches de levures, mettant en évidence une hétérogénéité des préférences selon la souche (Gobert *et al.*, 2017).

3.1.3. *Eléments minéraux et vitamines*

Les éléments minéraux présents dans le moût en faibles concentrations sont des micronutriments parfois essentiels au développement et au métabolisme de la levure *S. cerevisiae*. Ces derniers interviennent dans diverses fonctions telles que le transport de différents métabolites exogènes, les réactions enzymatiques en tant que cofacteur, ou encore dans la transduction du signal. Parmi ceux-ci on retrouve, les molécules minérales K, Na, Ca, Mg et leurs sels associés (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012). En moût, le potassium représente l'essentiel des matières minérales du moût de 50 à 80%. On retrouve également des oligo-éléments tels que le Mn, ou encore le Zn. Ce dernier est un cofacteur essentiel au bon fonctionnement de l'enzyme alcool déshydrogénase impliquée dans la fermentation alcoolique (Walker & Stewart, 2016). Ce dernier a été décrit pour participer à une fermentation optimale à une concentration de 1,5 and 2,5 µg.ml⁻¹ (Walker *et al.*, 2009). Bien que les ressources en éléments minéraux du moût soient le plus souvent suffisantes pour la levure, il est parfois nécessaire de compléter les moûts.

A faibles concentrations, les vitamines contribuent à la croissance des levures telle que *S. cerevisiae*. Certaines d'entre elles se retrouvent être essentielles à la croissance cellulaire et diverses fonctions physiologiques en arborant différents rôles tels que des fonctions

catalytiques ou encore une action de cofacteurs intervenant dans un grand nombre de voies métaboliques (Perli et al., 2020). Ces dernières se retrouvent être également des précurseurs de divers composés dont l'inositol précurseur du phosphatidylinositol, impliqué dans la signalisation cellulaire ou encore dans la synthèse des lipides, la pyridoxine ou encore le CoA donneur d'un groupe prosthétique et fonctionne comme transporteur de groupes acyle, amino-acyle qui donnent lieu à la synthèse d'acides gras ou des acides aminés. La nature des vitamines ainsi que leurs concentrations se révèlent très aléatoires selon le moût analysé. En outre, les besoins en vitamines de *S. cerevisiae* restent encore très controversés et apparaissent comme souche dépendante (Evers et al., 2021). Bien que la levure *S. cerevisiae* soit capable de synthétiser certaines de ces vitamines, une supplémentation du moût est parfois nécessaire. Toutefois, il est à noter que selon la concentration en sources azotées, *S. cerevisiae* présentait une sensibilité hétérogène aux carences en vitamines comme l'acide pantothénique (Duc et al., 2017; Wang et al., 2003).

3.1.4. Lipides

Les lipides présentent divers rôles essentiels pour la cellule levurienne telles que des fonctions structurales, de signalisation, d'intermédiaires métaboliques ou encore sont utilisés comme une source d'énergie. Les acides gras insaturés représentent la majeure partie des lipides retrouvés dans le moût (Beltran et al., 2008). Cependant, des stérols dont le β -sitostérol, sont également retrouvés. Le moût de raisin contient de faibles teneurs en lipides. Ces concentrations varient selon plusieurs facteurs comme le cépage, les conditions environnementales, mais les techniques de vinification peuvent également en être la cause (Casalta et al., 2019). Par ailleurs, en conditions de vinification, les levures sont soumises à différents stress parmi lesquels on retrouve : les sources nutritionnelles, la température, la teneur croissante en éthanol et l'anaérobiose qui peuvent entraîner une variation de la teneur en lipides utile à la levure. En effet, il a été reporté que les conditions environnementales induisaient une modification de la composition en lipides de la membrane ainsi qu'une augmentation de la production de composés toxiques pour la cellule par la voie de synthèse des acides gras (Tesnière, 2019). L'anaérobiose induit, en effet, une inhibition de la production d'acides gras insaturés et de stérols eux-mêmes essentiels à la structure et le maintien de la membrane cellulaire de *S. cerevisiae* notamment face à la concentration croissante en éthanol dans le milieu (Alexandre et al., 1994; Ribéreau-Gayon et al., 1975; Van der Rest et al., 1995). En outre, il a été rapporté qu'une oxygénation du moût peut induire une hausse de la synthèse d'ergostérol et d'acides gras insaturés afin de favoriser la croissance des levures et par conséquent la dégradation des

sucres (Mbuyane et *al.*, 2021). En 2013, Tesnière et collaborateurs (Tesnière et *al.*, 2013), ont observé que pendant la fermentation alcoolique, la perte de viabilité de la levure associée à la limitation de la croissance de la levure par l'ergostérol était modulée par la teneur en azote du milieu, une importante concentration en azote entraînant la mort cellulaire de la levure. Ceci a été également vérifié en appliquant une privation en acide oléique et ergostérol en conditions d'excès d'azote. Cet excès d'azote serait donc à l'origine d'une inhibition du déclenchement du mécanisme mis en place lors de privations nutritives qui maintient les cellules de levure en vie (Duc et *al.*, 2017).

3.1.5. L'oxygène

Les besoins en oxygène dissous dépendent à la fois de la composition du moût et des souches de levures (Julien et *al.*, 2000). En moyenne, sa concentration initiale est comprise entre 5 et 10 mg.l⁻¹, en revanche l'anaérobiose en conditions fermentaires apparaît dans les premières heures de vinification (Jacques et *al.*, 2003). L'oxygène est étroitement lié aux développement et métabolisme respiro-fermentaire de la levure. En effet, il intervient dans la modification de la membrane cellulaire ainsi que dans les premières étapes de dégradation des sucres en inhibant indirectement les enzymes de la glycolyse dont la phosphofructokinase. En outre, l'oxygène est impliqué dans la synthèse de lipides dont l'ergostérol, dont la synthèse est inhibée en conditions anaérobies. L'oxygène apparaît donc comme un paramètre essentiel, en orientant le métabolisme de la levure *S. cerevisiae* (Varela et *al.*, 2012).

3.2. Métabolisme carboné central (MCC)

Les levures *S. cerevisiae* sont, comme évoqué précédemment, des organismes respiro-fermentaires, qui selon les conditions environnementales peuvent avoir recours à différentes voies pour assimiler les sucres présents dans le moût de raisin : la respiration cellulaire et la fermentation alcoolique. Celles-ci vont s'adapter tout particulièrement aux conditions d'aération et à la concentration en sources carbonées. L'assimilation des sucres va contribuer à la production d'énergie via une action conjointe des voies anaboliques et cataboliques du MCC. Les deux processus vont être initiés de la même manière en empruntant tous deux, la voie de la glycolyse.

3.2.1. La glycolyse

La glycolyse souvent appelée voie d'Embden-Meyerhof (Embden-Meyerhof, 1940) correspond à une suite de réactions permettant la conversion du glucose ou fructose environnant en pyruvate, élément central du métabolisme levurien (Figure 4). Cette voie comprend neuf

réactions en chaîne mettant en jeu des enzymes de différentes natures. Ce processus oxydatif fait intervenir le cofacteur NAD^+ en tant qu'accepteur d'électrons et permet la production globale de 2 molécules d'ATP pour une molécule de sucre métabolisé.

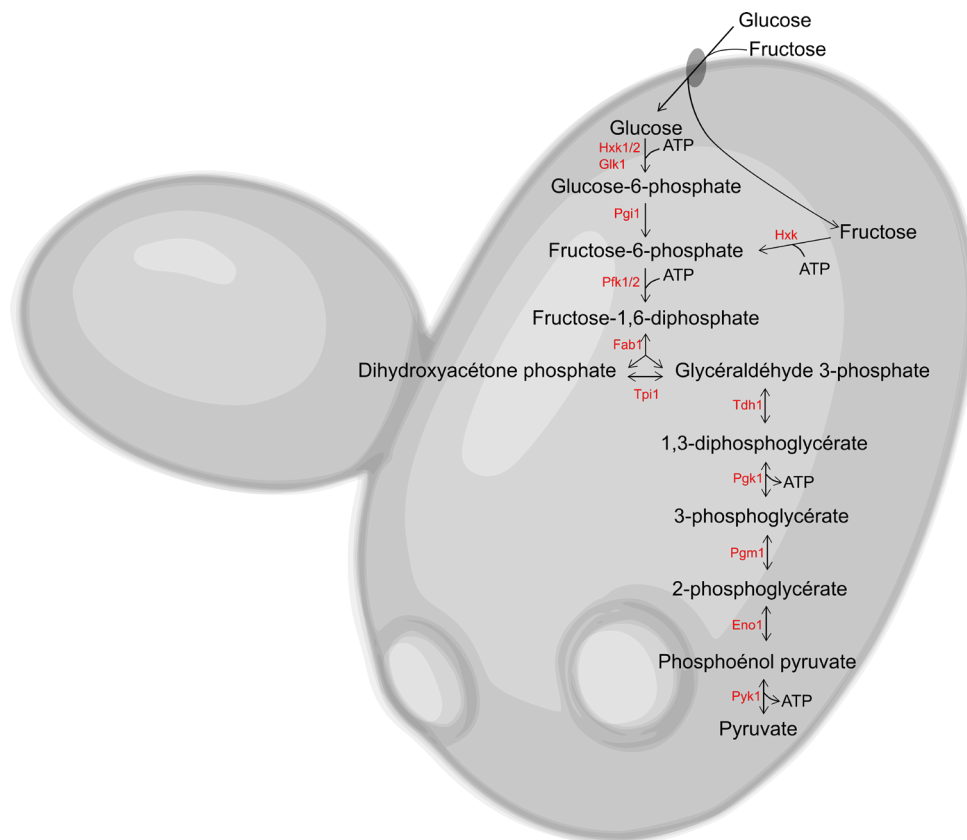


Figure 4 : Voie de la glycolyse. Enzymes mises en jeu (rouge) : Hxk1/2 : Hexokinase, Glk1 : Glucokinase 1, Pgi1 : Glucose-6-phosphate isomérase, Pfk1/2 : Phosphofruktokinase, Fab1 : Fructo-biphosphate aldolase, Tpi1 : Triosephosphate isomérase, Tdh1 : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase 1, Pfk1 : 3-phosphoglycérate kinase 1, Pgm1 : Phosphoglycérate mutase, Eno1 : Enolase 1, Pyk1 : Pyruvate kinase

La première étape de la glycolyse correspond à la transformation en trois étapes du glucose en fructose-1,6-diphosphate (F1,6-diP). Une première phosphorylation du glucose en glucose 6-phosphate (G6P) par une hexokinase est mise en jeu. Le G6P est ensuite isomérisé en fructose-6-phosphate (F6P) par la glucose-6-phosphate isomérase. Le F6P est alors converti en F1,6-diP par la phosphofruktokinase. La deuxième phase consiste en la conversion du F1,6-diP en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et dihydroxyacétone phosphate (DHAP) par action catalytique d'une aldolase. Le DHAP, forme cétone peut être isomérisé par la triosephosphate isomérase en G3P ou bien suivre la voie de la néoglucogénèse. Enfin la dernière étape, comprend trois réactions visant à transformer le 3-phosphoglycérate en pyruvate. Le 3-phosphoglycérate par l'intermédiaire d'une mutase est muté en 2-phosphoglycérate qui est lui-même déshydraté par une émolase en phosphoénolpyruvate pour enfin former du pyruvate dont la formation est catalysée par une kinase.

C'est à la suite à la formation du pyruvate, que la levure *S. cerevisiae* va, selon les conditions environnementales, se diriger vers différentes voies métaboliques.

En présence d'oxygène, la respiration cellulaire va être favorisée.

3.2.2. La respiration cellulaire

En condition aérobie, le pyruvate provenant de la glycolyse est oxydé par décarboxylation oxydative en présence de coenzyme A (CoA) et de Nicotinamide Adénine Dinucléotide sous la forme oxydée (NAD^+) générant de du NADH, H^+ , de l'acétyl-CoA et du CO_2 . Cette étape réalisée au sein de la mitochondrie est régie par le complexe enzymatique de la pyruvate déshydrogénase (Figure 5). L'acétyl-CoA est alors oxydé sous forme de CO_2 et d'oxaloacétate par une succession de huit réactions enzymatiques différentes au cours du cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques. Celui-ci est également réalisé au sein de la mitochondrie et permet par la formation de cofacteurs réduits la production d'énergie. L'acétyl-CoA est tout d'abord condensé avec l'oxaloacétate pour donner du citrate, composé à six carbones. L'isomérisation du citrate en isocitrate est ensuite menée, en deux étapes, par une aconitase. Une isocitrate déshydrogénase est par la suite mise en jeu afin de décarboxyler en α -cétoglutarate. Ce dernier est lui-même décarboxylé en succinate par un complexe α -cétoglutarate déshydrogénase dont le NAD^+ est l'accepteur d'hydrogène. La fumarate déshydrogénase et la réduction du FAD permettent l'oxydation du succinate en fumarate. Enfin, le fumarate est hydraté en L-malate permettant également la régénération de l'oxaloacétate par oxydation et couplée à la réduction du NAD^+ grâce à la malate déshydrogénase.

Les coenzymes réduits produits au cours de ce cycle vont être pris en charge et réoxydés dans la chaîne respiratoire ou phosphorylation oxydative. Ce mécanisme complexe permet la production d'énergie en fonction des besoins cellulaires sous forme d'ATP. Cette chaîne respiratoire fait intervenir trois complexes enzymatiques (NADH déshydrogénase, Cytochrome réductase et Cytochrome oxydase). Ainsi, cette phosphorylation oxydative va dégager à partir d'une molécule de glucose 16 molécules d'ATP. Par conséquent, le rendement énergétique en conditions respiratoires se trouve être huit fois supérieur à celui de la fermentation alcoolique (Bakker et *al.*, 2001). Cette différence de rendement énergétique impacte majoritairement la production de biomasse.

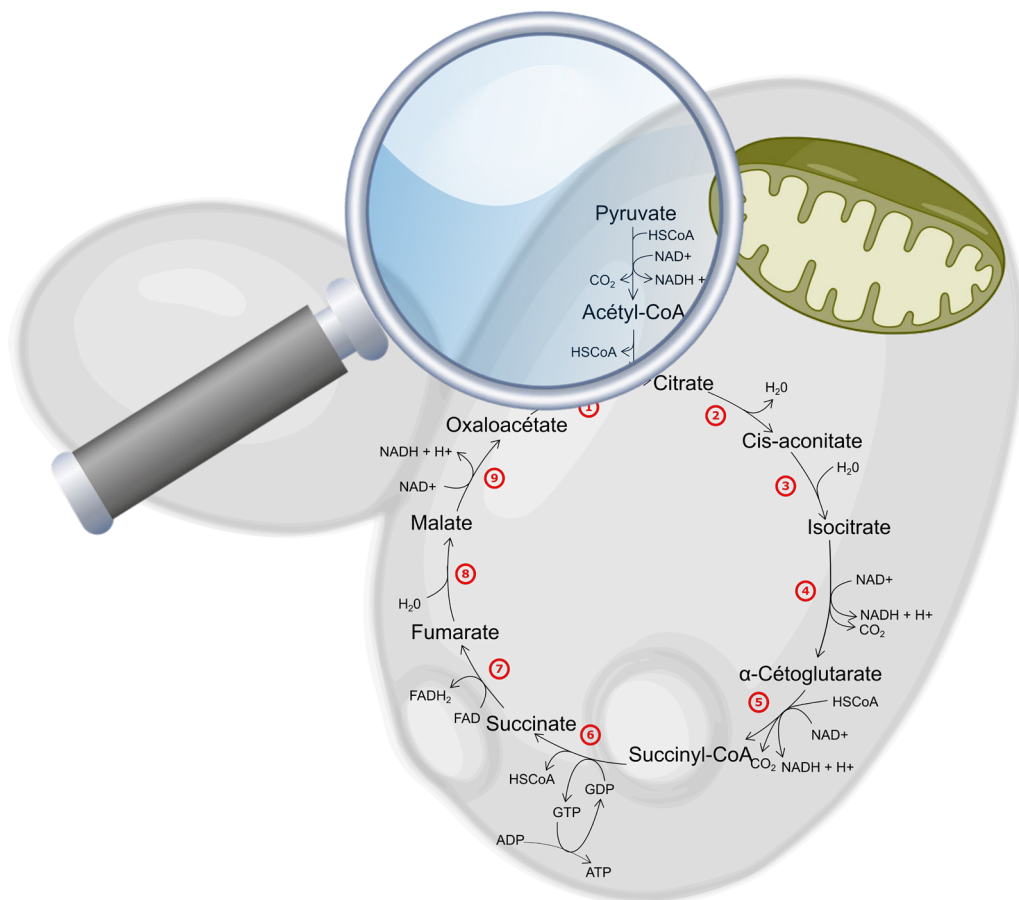


Figure 5 : Cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques. Enzymes mises en jeu (rouge) : 1 : Citrate synthase, 2-3 : Aconitase, 4 : isocitrate déshydrogénase, 5 : Complexe α -cétoglutarate déshydrogénase, 6 : Succinyl-CoA synthase, 7 : Succinate déshydrogénase, 8 : Fumarase, 9 : Malate déshydrogénase

Cependant en conditions de vinification (anaérobiose), le métabolisme fermentaire devient majoritairement représenté. Bien que la majorité des sources carbonées soit prise en charge par ce dernier, le cycle de Krebs reste essentiel pour la synthèse de composés céto-acides nécessaires à la synthèse des acides aminés (Partie 3.4.2) eux-mêmes impliqués dans la formation de composés volatiles (Partie 3.5). La succinate déshydrogénase impliquée dans la conversion du succinate en fumarate se retrouve néanmoins inactive, en conditions anaérobies ou de répression catabolique du glucose. Son action nécessitant la présence de Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) produit uniquement en conditions respiratoires est inhibée. Le cycle de Krebs s'oriente alors sous forme de deux voies métaboliques distinctes (Figure 6) et non plus en tant que cycle comme présenté précédemment. Aussi, une voie réductrice est décrite pour conduire majoritairement au fumarate ainsi qu'une voie oxydative qui conduit à la synthèse de l' α -cétoglutarate (Camarasa et *al.*, 2003).

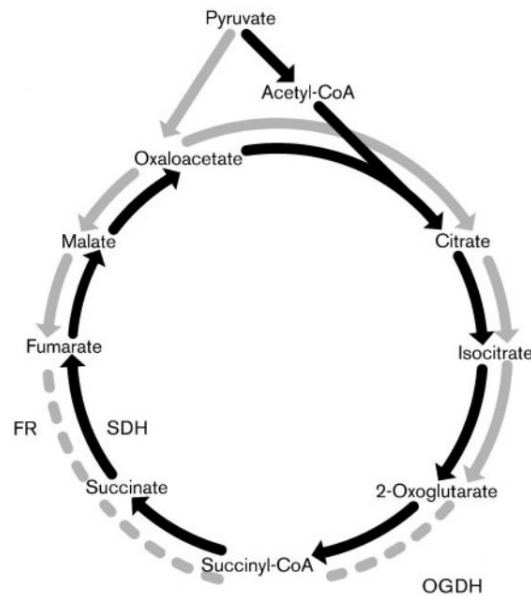


Figure 6 : Voies oxydative et réductrice en condition d'anaérobiose (Camarasa et al., 2003)

La teneur en sucres du milieu va également intervenir dans l'itinéraire d'assimilation des sucres dans le cadre de la vinification. Il est, en effet, possible de distinguer les levures selon l'effet Crabtree ou répression catabolique du glucose (Crabtree, 1929). Les levures dites « Crabtree positives » telle que *S. cerevisiae* malgré la présence d'oxygène arbore un métabolisme fermentaire tandis que les levures dites « Crabtree négatives » vont donner lieu par respiration cellulaire uniquement à une production de biomasse et de CO_2 (Figure 7). En effet, en présence d'une pression établie par une importante concentration en sucres dans le milieu, malgré la présence d'oxygène, la levure Crabtree positive s'engage majoritairement dans un métabolisme fermentaire (Rosenfeld & Beauvoit, 2003). En vinification du fait de la faible surface du moût en contact avec l'air ambiant, cette voie est donc sollicitée (Combina et al., 2005).

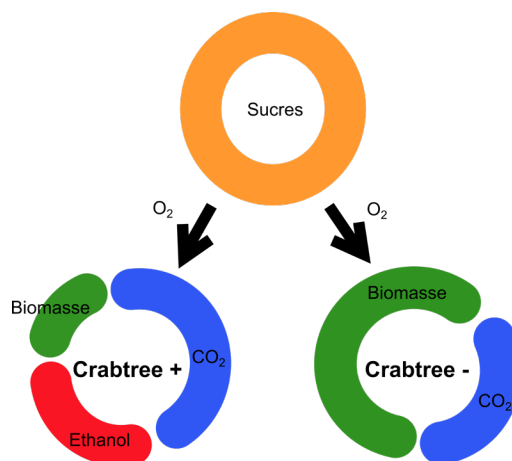


Figure 7 : Schéma résumant l'effet Crabtree (Adapté de (Dashko et al., 2014))

3.2.3. La fermentation alcoolique

Le métabolisme fermentaire est privilégié en conditions anaérobies. *S. cerevisiae* convertit le pyruvate issu de la glycolyse en éthanol afin de garantir un apport en énergie pour contribuer à sa croissance cellulaire (Figure 8). Le pyruvate issu de la glycolyse est alors décarboxylé en acétaldéhyde et CO_2 . Cette réaction est catalysée par la pyruvate décarboxylase (Pdc1) avec pour coenzyme la thiamine pyrophosphate (TPP). L'acétaldéhyde est enfin réduit en éthanol, par une alcool déshydrogénase permettant la réoxydation du NADH.

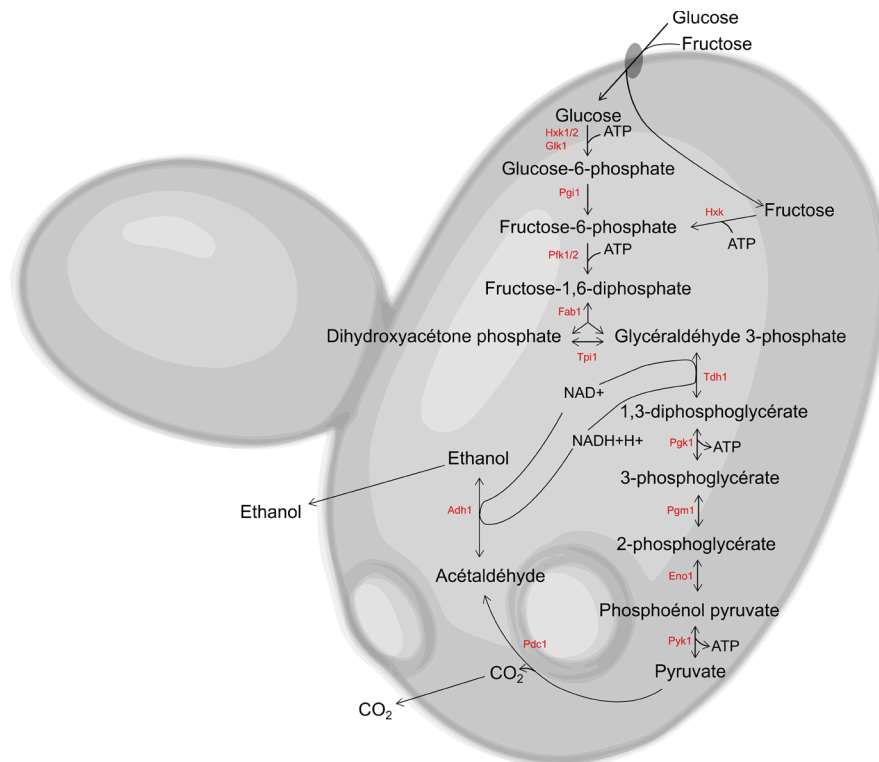


Figure 8 : Métabolisme des sucres en conditions fermentaires. Enzymes mises en jeu (rouge) : Hxk1/2 : Hexokinase, Glk1 : Glucokinase 1, Pgi1 : Glucose-6-phosphate isomérase, Pfk 1/2 : Phosphofruktokinase, Fab1 : aldolase, Tpi1 : Triosphosphate isomérase, Tdh1 : Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase 1, Pgm1 : Phosphoglycérate kinase 1, Pgm1 : Phosphoglucomutase, Eno1 : Enolase 1, Pyk1 : Pyruvate kinase, Adh1 : Alcool déshydrogénase 1, Pdc 1 : Pyruvate décarboxylase 1.

Cette dernière étape conduit à la réoxydation du NADH en NAD^+ . Cette consommation de NADH cellulaire va entraîner la formation de glycérol à partir du glucose afin de régénérer le pool de NADH cytosolique. La synthèse de glycérol permet ainsi de conserver un équilibre redox neutre. En outre, le glycérol agit comme osmorégulateur dans des conditions de pression osmotique et comme précurseurs des phospholipides essentiels à l'intégrité membranaire. Le glycérol est formé par réduction du DHAP en G3P faisant intervenir la déshydrogénase 3-phosphate soumise au NAD^+ . Ce dernier est déphosphorylé en glycérol par l'action catalytique de la glycérol 3-phosphatase (Figure 9).

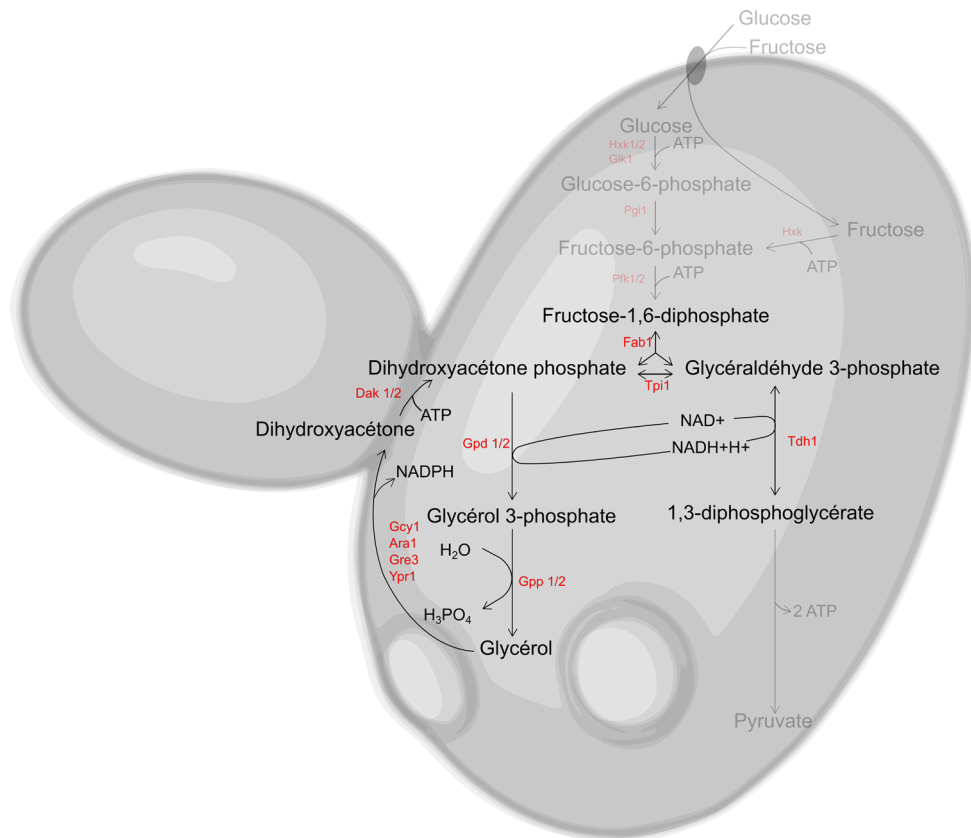


Figure 9 : Fermentation glycéropyruvique. Enzymes mises en jeu (rouge) : Fab1 : aldolase, Tpi1 : Triosphosphate isomérase, Tdh1 : Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase 1, Gpd1glycerol 3-phosphate déshydrogénase, Gpp1/2 : glycérol-3-phosphatase, Gcy1, Ara 1, Gre3, Ypr1 :Glycérol déshydrogénases, Dak1/2 : Dihydroxyacétones kinases

3.2.4. Voie des pentoses phosphates (VPP)

La voie des pentoses phosphate (VPP) est une des voies métaboliques du métabolisme énergétique tout comme la glycolyse participant à l'assimilation des sucres. Le flux de carbone à travers cette voie serait dépendant de la disponibilité en oxygène, la teneur en sucres du milieu pouvant varier entre 1,5 et 54,7%. Cadière et collaborateurs ont pu établir que 11% des sources carbonées disponibles dans un moût synthétique étaient dirigés vers cette voie pour la souche commerciale de *S. cerevisiae* EC1118 (Cadière et al., 2011). Elle fournit des précurseurs essentiels à la production de biomasse et est également la principale voie de régénération du NADPH soit environ 60% (Blank et al., 2005; Frick & Wittmann, 2005). Deux phases se succèdent : une phase oxydative irréversible permettant la synthèse de ribulose-5 phosphate et deux NADPH à partir de glucose 6-phosphate ainsi qu'une phase 2 non oxydative réversible qui conduit à la production de ribose 5-phosphate et érythrose 4-phosphate (Figure 10).

Cette deuxième étape consiste en l'interconversion entre les différents intermédiaires de la VPP que sont le ribulose 5-phosphate, le ribose 5-phosphate, le xylulose 5-phosphate, l'érythrose 4-phosphate, le sédoheptulose 7-phosphate, le F6P et le G3P. Ces interconversions

sont régies par un ensemble d'enzymes regroupant des transcétolases (Tk11, Tk12) une aldolase (Tal1), une épimérase (Rpe1) et une isomérase (Rk11).

Les produits de cette voie interviennent comme intermédiaires dans d'autres voies du métabolisme dont celui des acides aminés aromatiques et des nucléotides.

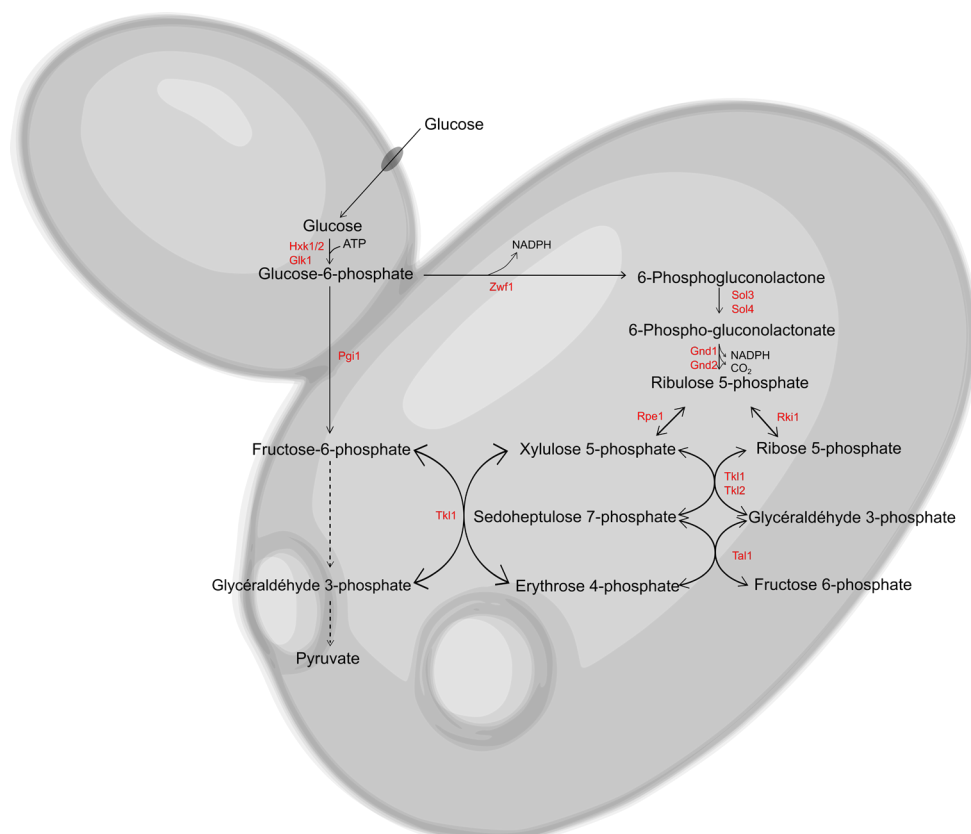


Figure 10 : Voie des Pentoses Phosphate (VPP). Enzymes mises en jeu (rouge) : Hxk1/2 : Hexokinase, Glk1 : Glucokinase 1, Pgi1 : Glucose-6-phosphate isomérase, Sol3/4 : 6-phosphogluconolactonase, Gnd1/2 : 6-phosphogluconate déshydrogénase, Rpe1 : Ribulose-phosphate 3 épimérase, Rki1 : Ribose-5-phosphate-ketolisomérase, Tk1/2 : Transcétolase, Tal1 : Transaldolase

3.3. Métabolisme des lipides

Les lipides sont essentiels pour la levure et arborent différentes fonctions. Ils sont à la fois une source d'énergie, participent également à la structure cellulaire et au transport de molécules nutritives. Les lipides sont des constituants essentiels de la membrane cellulaire qui n'est rien d'autre qu'une bicouche lipidique dont la composition varie en fonction des conditions environnementales. Aussi une modulation de cette composition lipidique peut induire une modulation des transports d'acides aminés ou encore de transporteurs de type ATPase (Aguilera et *al.*, 2006). Les apports en lipides nécessaires à la cellule sont assurés par la synthèse d'acides à gras, l'assimilation de lipides exogènes, mais également par turnover de lipides intracellulaires disponibles. Il existe différentes classes de lipides dont les acides gras,

les phospholipides, les stérols et les sphingolipides. Les acides gras libres se retrouvent en faible quantité mais sont décrits comme indispensables pour la synthèse des autres classes de lipides.

3.3.1. Biosynthèse des lipides

3.3.1.1. Synthèse d'acides gras

La synthèse *de novo* des acides gras qui requière la présence d'acétyl-CoA a lieu essentiellement dans le cytosol. L'acétyl-CoA est dans un premier temps carboxylé par une carboxylase (Acc) en malonyl-CoA par addition de CO₂. Cette réaction irréversible est nécessairement consommatrice de biotine, cofacteur essentiel. Le malonyl-CoA produit sert alors de donneur à deux carbones dans une série de réactions enzymatiques complexes faisant intervenir une acide gras synthase, une élongase et une réductase (Tehlivets et *al.*, 2007). Le complexe Fatty Acid Synthase (FAS) induit une condensation successive d'unités à 2C de malonylCoA sur une molécule d'acétyl-CoA. Le complexe FAS conduisant à l'élongation de la chaîne carbonée est formée de deux sous-unités protéiques présentes chez *S. cerevisiae* (Fas1 et Fas2). Une fixation transitoire de l'acétyl-CoA à ces deux sous-unités est possible au niveau de deux sites : un groupement thiol central ou SHc et un groupement phospho-pantéthéine périphérique ou SHp. Ce groupement SHp est constitutif d'une protéine multimérique ACP (Acyl Carrier Protein) qui initie le transport des chaînes acyles vers les différents sites d'élongation. Les acides gras, pour la levure peuvent par élongation être composés jusqu'à 16 ou 18 atomes de carbone (Casu et *al.*, 2018; Malfeito-Ferreira et *al.*, 1997).

Les acide gras produits sont alors susceptibles de subir différentes réactions telles que l'élongation ou encore la désaturation pour former des acides gras insaturés. En effet, des désaturases, protéines du réticulum endoplasmique, introduisent des doubles liaisons à des zones spécifiques des chaînes acyles, selon la catégorie de l'enzyme. Ces réactions nécessitent la présence d'O₂. La Δ9 et Δ12 désaturases sont les seules présentes chez *S. cerevisiae*. Aussi les acides saturés et monoinsaturés sont majoritairement produits. Parmi eux, on retrouve acides palmitiques (C16), oléiques (C18), palmitoléiques (C16 :1), linoléiques (C18 :1) (Nasution et *al.*, 2017).

3.3.1.2. Synthèse des glycérolipides

Les glycérolipides sont des acides gras estérifiés avec du glycérol. Parmi eux, on retrouve des lipides dits neutres et les phospholipides qui comprennent un groupe phosphoryle.

Lipides neutres

La biosynthèse des lipides neutres est conduite à partir de l'acide phosphatidique (PA), provenant du glycérol 3-phosphate, et décrit comme le précurseur clé de la synthèse des glycérolipides. Au sein des lipides dits neutres on retrouve, les triacylglycérols (TAG). Ils constituent la forme majeure de stockage d'acides gras chez la levure (Daum *et al.*, 1998). Constitué de glycérol estérifié avec trois acides gras, les TAG sont issus du diacylglycérol (DAG). Les DAG formé à partir de l'AP, dont la réaction est catalysée par la phosphatase Pah1 sont par la suite acylés par une transférase acyl-CoA dépendante (Lro1) pour former les TAG correspondants (Figure 11).

Phospholipides

Les phospholipides principalement retrouvés chez la levure sont : le phosphatidylinositol (PI), la phosphatidyl-sérine (PS), la phosphatidyl-éthanolamine (PE), la phosphatidylcholine (PC) et le diphosphatidylglycérol (cardiolipine) (Daum *et al.*, 1998).

Ces phospholipides sont décrits pour jouer un rôle majeur dans la structure membranaire, signalisation cellulaire, la réception membranaire et la synthèse protéique. La synthèse de ces phospholipides est réalisée dans divers compartiments cellulaires dont majoritairement dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique mais aussi se dérouler dans les gouttelettes lipidiques et l'appareil de Golgi. Tout comme pour les lipides neutres, l'AP est le précurseur de cette voie initiée selon les mêmes étapes élémentaires.

L'AP est converti en cytidine diphosphate-diacylglycérol (CDP-DAG) ou DAG par condensation de l'AP et la cytidine triphosphate par une CDP-DAG synthase (Shen *et al.*, 1996). En présence d'inositol, le CDP-DAG participe à la synthèse du PI par transfert de l'acyl (Le Guédard *et al.*, 2009).

La PS est un intermédiaire de la voie de synthèse des phospholipides majoritaires PC et PE. La PS est également formée à partir du CDP-DAG via une PS synthase (Cho1). La PS subit une décarboxylation pour former du PE qui par trois méthylations successives catalysées par deux enzymes Cho2 et Opi3 pour conduire à la formation de PC (Henry *et al.*, 2012).

Cette voie de biosynthèse régie par le CDP-DAG est la voie de synthèse majoritaire des phospholipides. Cependant, la PE et la PC peuvent également être produits respectivement à partir d'éthanolamine et de choline exogènes, en ayant recours à la voie de Kennedy (Figure 11). L'éthanolamine et la choline sont transportées par des transporteurs spécifiques, puis phosphorylées en présence d'ATP. Ces intermédiaires sont ensuite activés par transfert de cytidine triphosphate pour former du CDP-éthanolamine et CDP-choline respectivement. Enfin,

une phosphotransférase permet la réaction de ces derniers avec une molécule de DAG pour former la PE et la PC.

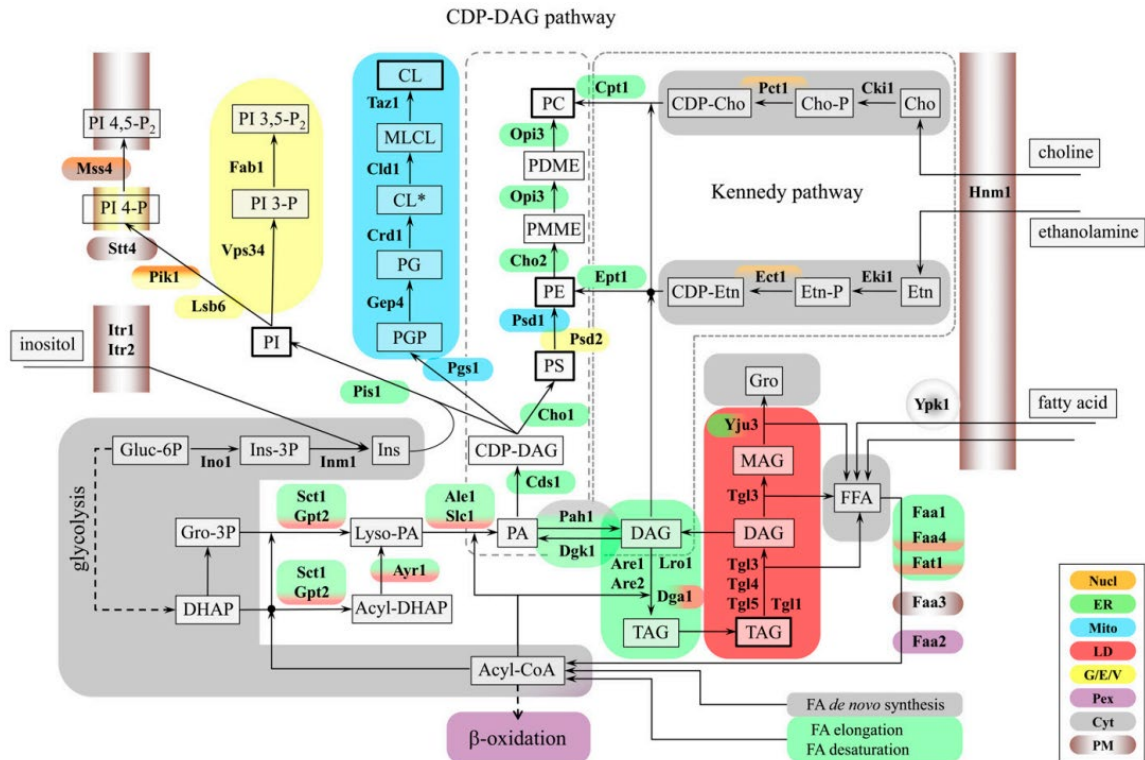


Figure 11 : Voies de synthèse des glycérolipides (Henry et al., 2012) Les abréviations utilisées sont : TAG, triacylglycérols; PI, phosphatidylinositol; PA, acide phosphatidique; CDP-DAG, CDP-diacylglycérol; DAG, diacylglycérol; MAG, monoacylglycérol; Gro, glycérol; DHAP, dihydroxyacétone phosphate, PS, phosphatidylsérine; PE, phosphatidyléthanolamine; PG, phosphatidylglycérol; PGP phosphatidylglycérol phosphate; CL* cardioline précurseur; MLCL, monolyso-cardiolipine; CL, cardioline mature; PMME, phosphatidylmonométhyléthanolamine; PDME, phosphatidyl-diméthyléthanolamine; PC, phosphatidylcholine; FFA, acides gras libres; Cho, choline, Etn, éthanolamine, Ins, inositol; Cho-P, choline phosphate; CDP-Cho, CDP-choline; Etn-P, éthanolamine phosphate; CDP-Etn, CDP-éthanolamine; PI 3-P, phosphatidylinositol 3-phosphate; PI 4-P, phosphatidylinositol 4-phosphate; PI 4,5-P₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PI 3,5-P₂, phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate. Nucl, noyau; ER, réticulum endoplasmique; Mito, mitochondries; LD, gouttelettes lipidiques; G/E/V, Golgi, endosomes, vacuole; Pex, peroxysomes; Cyt, cytoplasme; PM, membrane plasmique.

3.3.1.3. Synthèse des stérols

Les stérols participent comme les acides gras à différentes fonctions cellulaires dont majoritairement l'intégrité membranaire. La composition en stérols est effectivement déterminante pour la structure membranaire. L'ergostérol est le stérol dominant produit par les levures malgré la synthèse d'autres stérols tels que le zymostérol, le lanostérol et l'épistérol (Zinser et al., 1993). Sa synthèse nécessite cependant une importante consommation d'énergie requérant 24 molécules d'ATP et 16 molécules de NADPH contrairement à des acides gras libres. Cette voie se subdivise en trois modules (Figure 12). Les modules correspondent à la

biosynthèse du mévalonate, le la biosynthèse du farnésyl-PP et enfin la biosynthèse de l'ergostérol.

Celui-ci participe à différentes fonctions participant à la structure membranaire telles que la fluidité et la perméabilité membranaire. Il est également décrit pour avoir une activité enzymatique ainsi que de transport pour certains composés nutritifs (Mbuyane *et al.*, 2021).

Tout comme d'autres stérols, ce dernier peut être également estérifié avec des acides gras pour être stockés dans des gouttelettes lipidiques. Enfin depuis quelques années, il est largement étudié pour être un facteur essentiel dans la réponse aux divers stress subis par la levure au cours de la vinification (Dupont *et al.*, 2011; Tesnière, 2019).

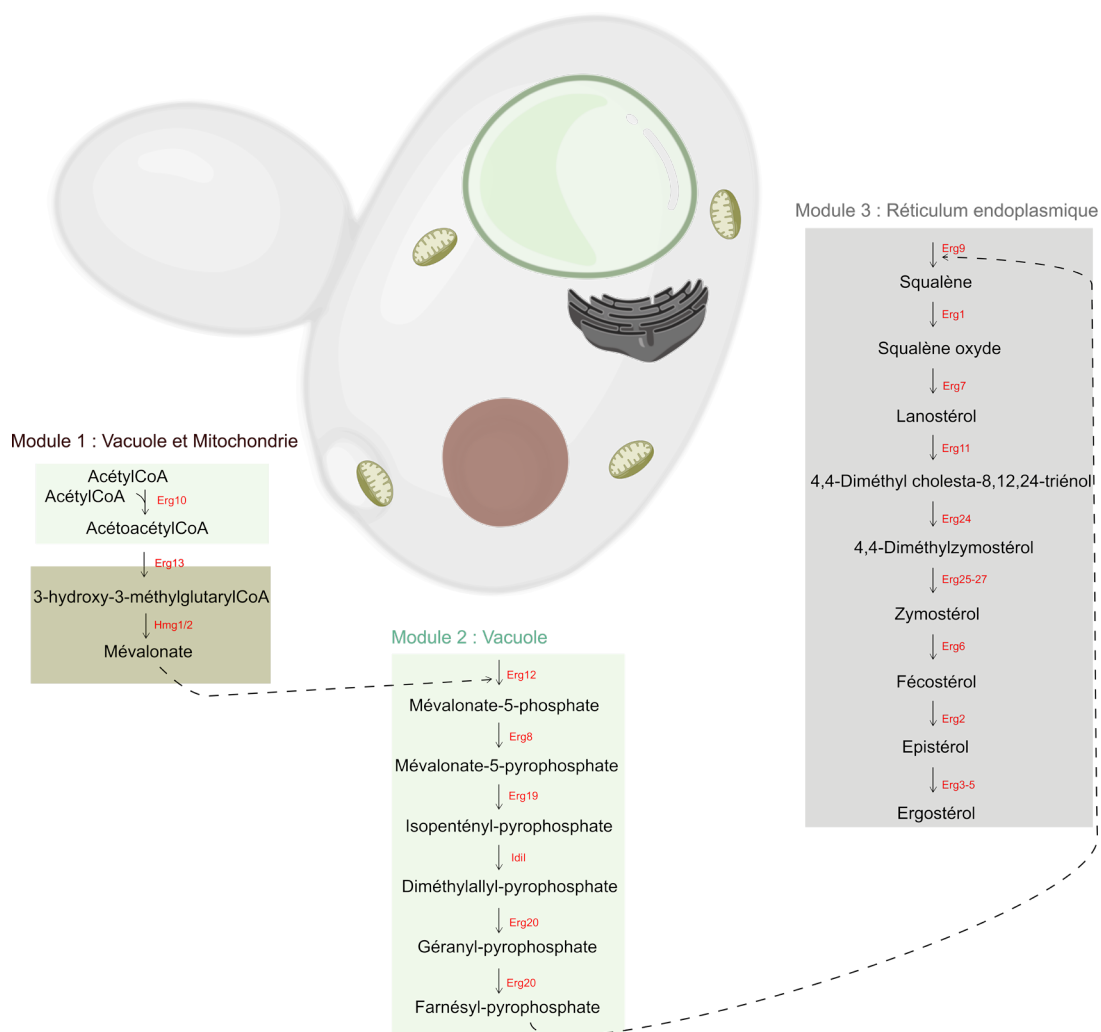


Figure 12 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez les levures (adapté d'après Mbuyane *et al.*, 2021). Enzymes mises en jeu (rouge) : Erg10 : Acétoacétyl-CoA thiolase, Erg13 : Hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase, Hmg1/2 : Hydroxyméthylglutaryl- CoA réductase, Erg12 : Mévalonate kinase, Erg8 : Phosphomévalonate kinase, Erg19 : Diphosphomévalonate décarboxylase, Idi1 : Isopentenyl diphosphate isomérase, Erg20 : polyprényl synthétase, Erg9 : squalène synthétase, Erg1 : squalène epoxydase, Erg7 : lanosterol cylase/synthase, Erg11 : Cytochrome P450 lanostérol 1,4a-diméthylase, Erg24 : stérol C14 réductase, Erg25 : C4 méthyl sterol oxydase, Erg26 : Sterol C4 décarboxylase, Erg27 : 3-céto-steroïde réductase, Erg6 : C24 sterol méthyltransférèse, Erg2 : C8 Stérol isomérase, Erg3 : C5 Stérol désaturase, Erg24 : C24(28) Stérol réductase, Erg5 : C22 Stérol désaturase

3.3.2. Catabolisme des lipides

Les lipides peuvent être catabolisés de différentes manières les rendant disponibles pour diverses fonctions. Les lipides présents dans les gouttelettes lipidiques peuvent être mobilisés et subir un turnover. En effet, lorsque les conditions environnementales changent, notamment en raison d'un appauvrissement en nutriments qui oblige les cellules à utiliser leurs ressources stockées. Les acides gras du TAG ou encore des esters de stérols peuvent soit être utilisés pour la production d'énergie par la voie de la β -oxydation ou comme éléments de base pour la synthèse des lipides membranaires. Le second produit de dégradation des TAG par hydrolyse, le diacylglycérol (DAG), est également utilisé comme substrat pour la synthèse *de novo* de phospholipides. Ce turnover conduit d'autre part à la production de NADH (Celton et al., 2012; Rajakumari et al., 2008).

En outre, la dégradation des acides gras libres utilise majoritairement la voie la plus décrite, la β -oxydation.

La β -oxydation des acides gras

S. cerevisiae présente la capacité via une voie catabolique de dégrader les acides gras à longue chaîne, connue sous le nom de β -oxydation. Cette voie est active uniquement en début de fermentation, car nécessitant la présence d'oxygène (Schreier & Jennings, 1979). Cette dernière est réalisée au sein du peroxyosome contrairement à d'autres eucaryotes supérieurs. Une série de réactions enzymatiques constituent cette voie menant à la libération d'une molécule d'acétyl-CoA et d'un acide gras à chaîne plus courte de deux atomes de carbone d'oxygène (Waché & Aguedo, 2002). En premier lieu l'acyl-CoA oxydase Fox1p catalyse l'insaturation des carbones α et β de l'acide gras, induisant son activation pour la suite de la réaction. Cette étape conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène lui-même dégradé par une catalase Cta1p en H₂O et O₂ (Maté et al., 1999). L'enzyme multifonctionnelle (MFE) est un complexe enzymatique catalysant les réactions deux et trois de la β -oxydation. Celui-ci réunit deux activités enzymatiques, 2-énoyl-CoA hydratase et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase pour conduire à la production de 3-cétoacyl-CoA (Hiltunen et al., 1992). Enfin, les 3-cétoacylCoA sont clivés par la thiolase 3-cétoacyl-CoA en acyl-CoA et acétyl-CoA.

D'autres enzymes dites auxiliaires interviennent également dans la β -oxydation. Ces enzymes participent à la prise en charge des acides gras insaturés. Parmi elles, on retrouve les 2,4-diénoyl-CoA réductase (ScSps19p) et Δ^3 - Δ^2 -énoylCoA isomérase (Gurvitz et al., 1999).

3.4. Métabolisme azoté

Dans le moût, comme évoqué précédemment, une importante diversité de sources azotées est retrouvée en quantité variable (Ribéreau-Gayon, 1999). Parmi les sources d'azote assimilables par la levure présentes dans le moût, sont retrouvés les oligopeptides dont le poids moléculaire est inférieur à 1 kDa. Ces sources représenteraient plus de 10% de l'azote assimilable (Marsit et al., 2015), et sembleraient avoir un impact sur le métabolisme de *S. cerevisiae*, dont le rendement fermentaire, la formation de composés volatiles tels que les esters acétate, mais également sur le potentiel redox de la cellule, ou encore sur la synthèse de certains acides organiques comme l'acétate (Duc et al., 2020). Toutefois, outre une hydrolyse de ces derniers en acides aminés libres, leur évolution à travers le métabolisme de *S. cerevisiae* est encore peu claire. Les études indiquent néanmoins, que ces derniers seraient assimilés par la levure par des transporteurs tels que ceux encodés par les gènes *PTR2*, *DAL5* et *FOT1-2* pour les di et tripeptides (Cai et al., 2007; Damon et al., 2011; Homann et al., 2005), *OPT1* pour les tétra/pentapeptides ou encore *OPT2* décrit dans le transport du glutathion (Aouida et al., 2009; Bourbouloux et al., 2000). Enfin, la présence des gènes *FOT* serait également impliquée dans une meilleure assimilation des oligopeptides conférant un avantage adaptatif à *S. cerevisiae* aux conditions environnementales (Marsit et al., 2015).

En outre, les deux sources d'azote assimilable ou Yeast Assimilable Nitrogen (YAN) les mieux décrites sont les acides aminés et l'ammonium dans le cadre de la fermentation alcoolique peuvent être classées selon leur vitesse d'assimilation. En effet, leur assimilation régie par une régulation complexe faisant intervenir divers systèmes (système SPS, NCR, GAAC, régulations transcriptionnelles) est différente pour chacune d'entre elles. Trois catégories ont été établies par Jiranek et son équipe (Jiranek et al., 1995). Cependant, l'ensemble des études s'attachant à décrire ces régulations, l'assimilation et la classification ne sont pas toutes en accord (Gobert et al., 2017). Plus généralement, les sources azotées sont classées en sources azotées assimilables préférentielles (classe A) ou non préférentielles (classe B) (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012; Wiame et al., 1985).

S. cerevisiae régule son métabolisme en fonction de la disponibilité et de la qualité de l'azote assimilable (YAN) dans le milieu en équilibrant à la fois l'assimilation, le catabolisme des sources exogènes d'azote ainsi que la synthèse *de novo* des acides aminés. Les sources d'azote exogènes peuvent être adressés, chez la levure, vers trois voies. Les composés azotés peuvent être dirigés vers la biosynthèse de macromolécules telles que les protéines. Cette incorporation directe ne nécessiterait aucune modification des sources azotées avant d'être métabolisé.

Cependant, cette voie semble représenter une faible fraction, vis à vis des autres voies pour former des acides aminés protéinogènes (Crépin et *al.*, 2017). Elles peuvent être, dans un second cas, stockées dans les vacuoles cellulaires (Crépin et *al.*, 2014). Enfin, elles peuvent être catabolisées pour être utilisées dans la formation *de novo* d'acides aminés. Ce dernier cas de figure permet le relargage d' α -cétoacides impliqués dans la formation de composés volatiles et le métabolisme carboné central.

3.4.1. Catabolisme des acides aminés

Les sources azotées non préférentielles sont catabolisées pour reformer un pool d'ions ammonium ou de glutamate. Ils seront alors dirigés vers le métabolisme azoté. Deux réactions réversibles sont interconnectées et interviennent pour régénérer ce pool (Magasanik & Kaiser, 2002) (Figure 13).

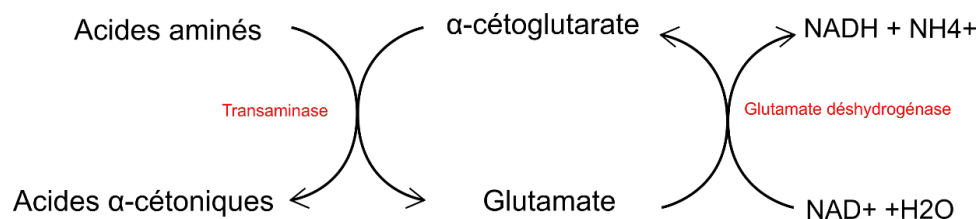


Figure 13 : Schéma de dégradation des acides aminés (d'après Pascal Ribéreau-Gayon et *al.*, 2012)

3.4.2. Biosynthèse des acides aminés

L'ensemble des acides aminés protéogéniques peuvent être synthétisés en présence de sources carbonées et d'ammonium au sein de la cellule (Sachs, 1996) (Figure 14). Dans un premier cas, l'ammonium peut être incorporé par le biais de l' α -cétoglutarate pour la synthèse du glutamate qui a un rôle central dans les réactions du métabolisme azoté. Cette réaction est catalysée par une glutamate déshydrogénase (Gdh1) dépendante du NADPH. L'ammonium est alors de nouveau incorporé pour la formation de la glutamine. La glutamine synthétase (Gln1) est mise en jeu dans cette réaction. Dans un second cas, l'ammonium peut être intégré directement en tant que source exogène dans la formation du glutamate et de la glutamine. Enfin, la biosynthèse peut être liée à la formation d'intermédiaires et d'acides organiques issus de la glycolyse et du TCA. Il est alors possible classer les différents acides aminés selon leur voie de biosynthèse comme suit :

- La famille du glutamate : glutamate, glutamine, arginine, proline et lysine

- La famille des acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine, tryptophane
- La famille des sérines : sérine, glycine, cystéine et méthionine
- La famille de l'aspartate : aspartate, asparagine, thréonine
- La famille des acides aminés sulfurés : cystéine et méthionine
- La famille des pyruvates : alanine, leucine, isoleucine

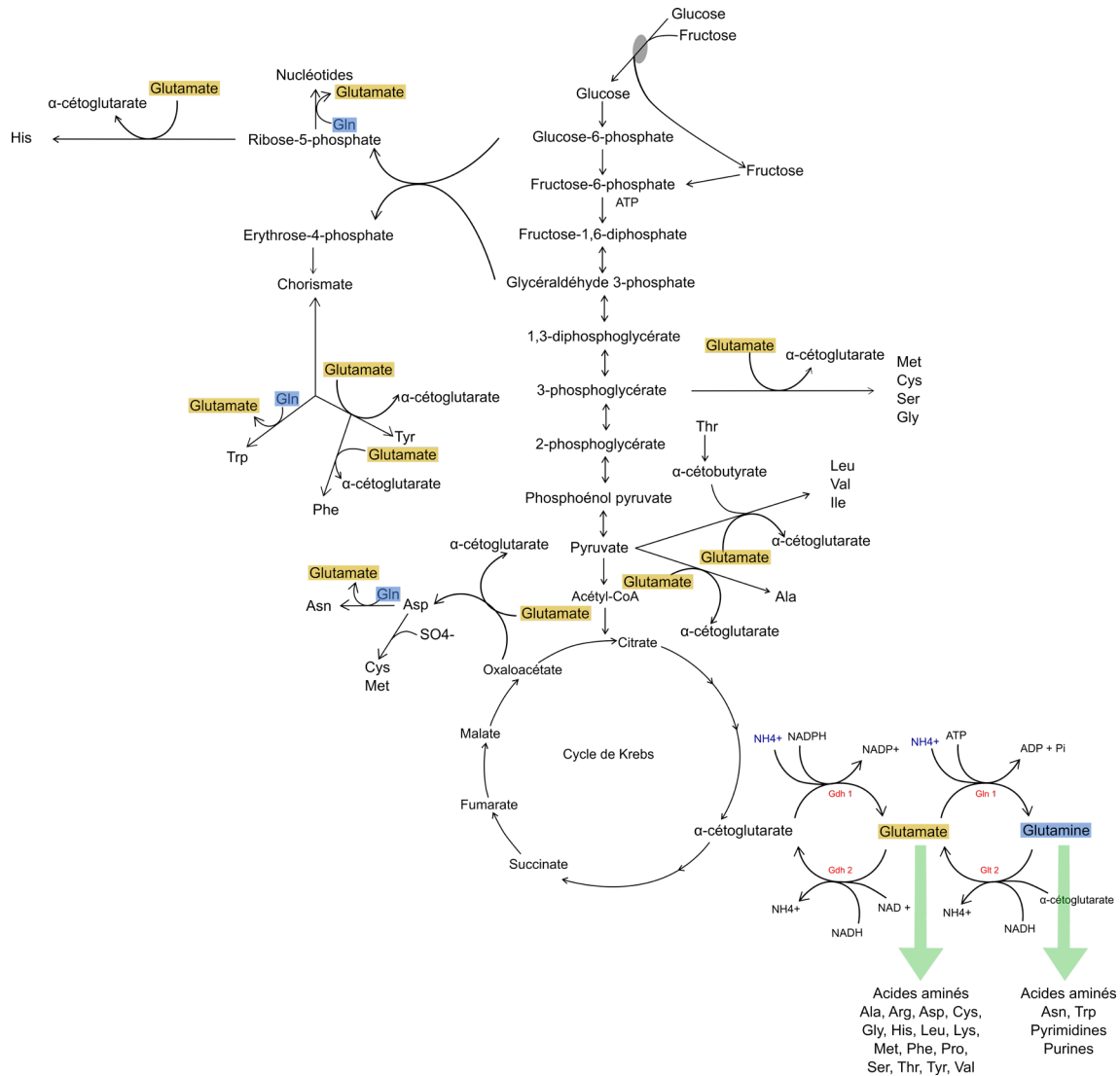


Figure 14 : Voie de biosynthèse des acides aminés (adapté d'après Magasanik and Kaiser, 2002 et Ljunghal et al., 2012)

Le métabolisme azoté est largement étudié depuis des années pour son implication majeure dans la formation de composés volatiles qui participent aux propriétés organoleptiques du produit fini. Les composés aromatiques du vin peuvent être classés selon leur origine : arômes variétaux, pré-fermentaires, fermentaires ou encore de vieillissement. Les arômes dits variétaux sont formés à partir de précurseurs inodores présents au niveau de la baie de raisin.

Ces composés sont souvent associés à un type de cépage (Francis & Newton, 2005). Au cours des premières étapes de vinification sont produits les arômes pré-fermentaires. Les arômes fermentaires sont issus quant à eux du métabolisme des micro-organismes œuvrant au cours des fermentations. Ces derniers originaires de *S. cerevisiae* nous intéresseront plus particulièrement. Enfin les arômes de vieillissement sont formés par réactions chimiques durant la maturation du vin.

3.5. Voies de synthèse des arômes fermentaires

Les arômes fermentaires correspondent donc à des composés volatiles issus du métabolisme de la levure au cours de la fermentation alcoolique. On retrouve différents types de composés aromatiques (Figure 15), cependant nous nous focaliserons sur les composés majoritaires produits.

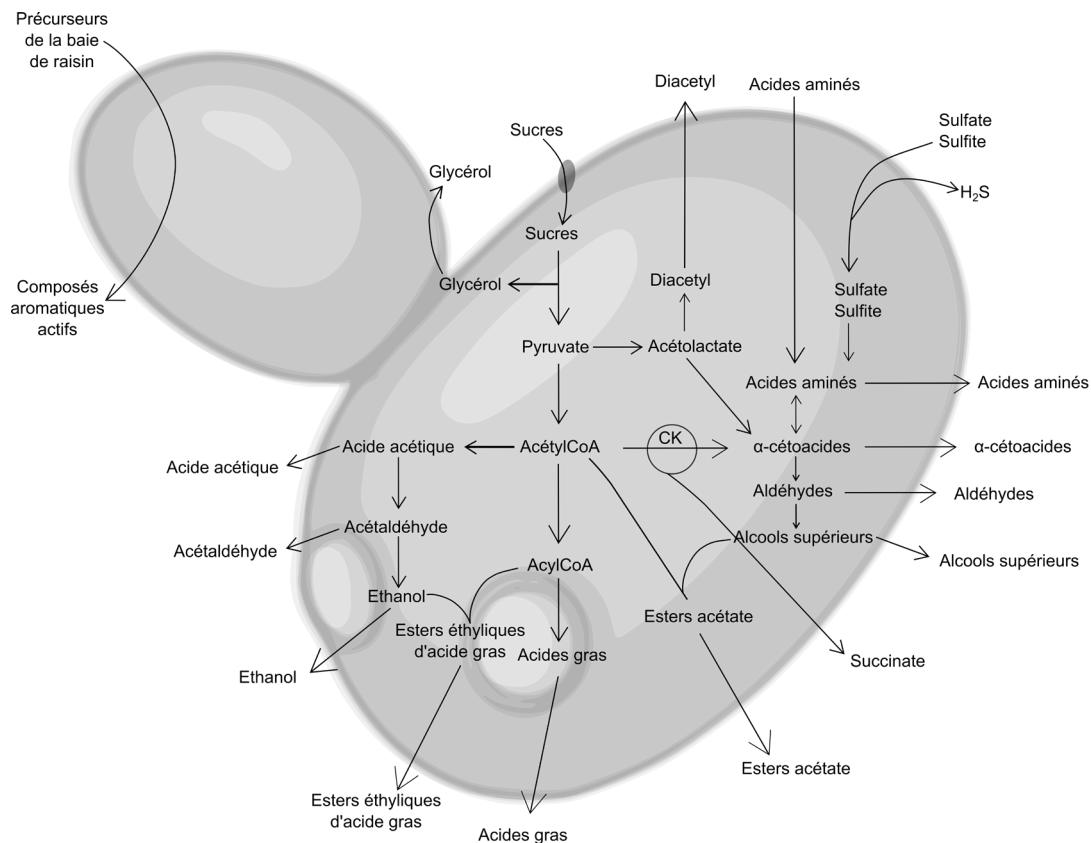


Figure 15 : Schéma de formation de l'ensemble des composés volatiles (adapté d'après (Dzialo et al., 2017; Lambrechts & Pretorius, 2000; Swiegers et al., 2005))

Les arômes fermentaires majoritaires synthétisés par *S. cerevisiae* sont les alcools supérieurs et les esters (Tableau 2). La combinaison de la plupart de ces arômes participe au socle aromatique du vin, malgré la présence de composés ayant un impact unitaire et déterminant sur le profil sensoriel du vin. Les alcools supérieurs et esters présents à

d'importantes concentrations confèrent des notes aromatiques négatives au vin (> 400 mg.l⁻¹), contrairement à leur présence à de faibles concentrations qui participent favorablement à ces arômes (< 300 mg.l⁻¹) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012).

Tableau 2 : Tableau listant les principaux composés volatiles fermentaires, leur seuil de perception et leur descripteur associée en vin

Composé	Concentration dans le vin (mg.l ⁻¹)	Seuil de perception dans le vin (mg.l ⁻¹)	Descripteur associé
Acétate d'éthyle	22.5 – 63.5	7.5*	Solvant, fruité
Acétate d'isoamyle	0.1 – 3.4	0.03**	Banane, bonbon anglais
Acétate de 2-phényléthyle	0 – 18.5	0.25*	Floral, rose, fruité
Acétate d'isobutyle	0.01 – 1.6	1.6	Banane, fruité
Acétate d'hexyle	0 – 4.8	0.7**	Bonbon, parfum
Butanoate d'éthyle	0.01 – 1.8	0.02*	Floral, fruité
Hexanoate d'éthyle	0.03 – 3.4	0.05*	Pomme verte
Octanoate d'éthyle	0.05 – 3.8	0.06	Savon
Décanoate d'éthyle	0 – 2.1	0.02*****	Floral, savon
Propanol	9 – 68	306* 500**	Apré
Butanol	0.5 – 8.5	150*	Spiritueux
Isobutanol	9 – 174	40*** 500**	Spiritueux
Alcool isoamylique	60 – 490	30*** 300**	Vernis, alcooleux
Alcool amylique	15 – 150	40****	Alcooleux
2-phényléthanol	4 – 197	14 *****	Floral, rose

3.5.1. Synthèse des arômes fermentaires

La synthèse des principaux arômes fermentaires fait intervenir le métabolisme central des levures à savoir les métabolisme azoté et carboné. Cependant, des composés sont également relargués par simple activité enzymatique de la levure tels que les thiols ou les terpènes (Carrau *et al.*, 2005).

3.5.1.1. Alcools supérieurs

Les alcools supérieurs (Tableau 3) résultent du catabolisme des acides aminés branchés (Leucine, Isoleucine, Valine), aromatiques (Tyrosine, Tryptophane, Phénylalanine) et soufrés (Méthionine) par la voie de Ehrlich (Ehrlich, 1907) qui constitue une hydrolyse enzymatique. Cette voie est divisée en trois étapes successives : une transamination, une décarboxylation et une réduction ou oxydation selon le produit de synthèse (Figure 16) (Hazelwood et *al.*, 2008).

Transamination

Un acide aminé est converti grâce à une amino-transférase en α -cétoacide. Le groupement amine de l'acide aminé est transféré vers l' α -cétoglutarate afin de former le glutamate. Quatre enzymes sont impliquées au cours de cette première étape telles que Bat1, Bat2, prenant en charge les acides aminés branchés tandis que Aro8 et Aro9 sont impliqués dans la transamination des acides aminés aromatiques. Ces enzymes agissent comme des transaminases et sont mobilisées selon les phases de croissance de la levure et la nature de l'acide aminé pris en charge.

Décarboxylation

L' α -cétoacide issu de cette première réaction subit alors une conversion en aldéhyde. Cinq gènes sont impliqués dans cette réaction. Trois d'entre eux (*PDC1*, *PDC5*, *PDC6*) codent pour des pyruvate décarboxylases, *ARO10*, pour une phénylpyruvate décarboxylase et enfin *THI3* décrit initialement pour coder pour une α -céto-isocaproate décarboxylase mais serait finalement impliquée dans la régulation catabolique des acides aminés.

Réduction des aldéhydes ou oxydation

Cette voie se conclue par la réduction ou l'oxydation de l'aldéhyde formé précédemment. La subdivision visant à réduire l'aldéhyde en alcool supérieur reste majoritaire malgré la formation minoritaire d'acides organiques par oxydation. Les 22 gènes impliqués dans cette étape finale sont, à l'inverse des autres gènes de la voie, peu spécifiques. L'équilibre entre ces deux subdivisions serait dépendant des conditions environnementales et principalement nutritives.

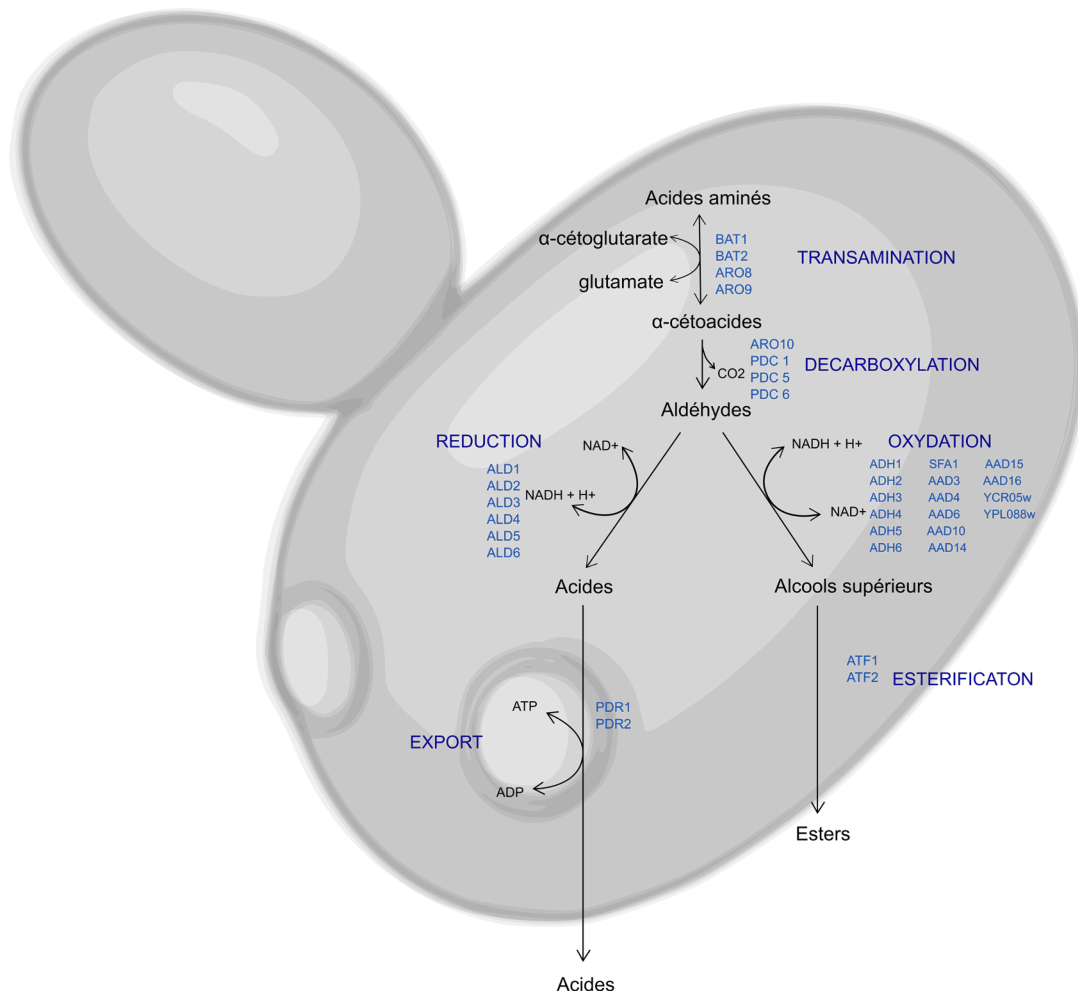


Figure 16 : Voie de Ehrlich (adapté d'après Hazelwood et al., 2008)

Bien que la voie d'Ehrlich soit décrite comme une voie importante dans la synthèse des alcools supérieurs, ils peuvent être également produits à partir du glucose. Les α -cétoacides sont notamment issus du métabolisme carboné de la levure comme décrit précédemment. Récemment, il a été montré par traçage des flux d'azote exogènes marqués que la plus grande part des α -cétoacides utiles à la formation d'alcools supérieurs étaient issus du MCC et non de la voie de Ehrlich (Crépin et al., 2017). Rollero et al., 2017 (Rollero et al., 2017) ont également confirmé la synthèse *de novo* d'acides aminés dont le squelette carboné provenait du MCC selon cette même approche, par filiation isotopique du C^{13} en traçant les deux acides aminés. Ces acides aminés participaient à la synthèse *de novo* α -cétoacides. Cette synthèse était cependant dépendante de la disponibilité en sources azotées du milieu extracellulaire.

Tableau 3 : Intermédiaires de la voie d'Ehrlich (d'après Hazelwood et al., 2008 et Dzialo et al., 2017)

Acide aminé précurseur	α -cétoacide	Aldéhyde	Alcool
Thréonine	α -cétobutyrate	Butyraldéhyde / Propionaldéhyde	1-propanol / 1-butanol
Isoleucine	α -cétométhylvalérate	Méthyl-valéraldéhyde	Alcool amylique
Valine	α -cétisovalérate	Isovaléraldéhyde	Isobutanol
Leucine	α -cétisocaproate	Isoamyl aldéhyde	Alcool isoamylique
Phénylalanine	Phénylpyruvate	2-phényl-aldéhyde	2-phényléthanol
Tryptophane	3-indolpyruvate	3-indole-acétaldéhyde	Tryptophol
Tyrosine	4-hydroxyphénylpyruvate	Hydroxyphénylacétaldéhyde	Tyrosol
Méthionine	2-cétométhylthiobutyrate	3-(méthylthio)-propionaldéhyde	Méthionol
Cystéine	Mercaptopyruvate	Mercapto-acétaldéhyde	2-mercaptoéthanol

3.5.1.2. Esters

Les alcools supérieurs sont également des précurseurs d'esters. Il existe deux catégories d'esters : les esters acétate et les esters éthyliques. Ces composés sont connus pour être moins toxiques et avoir un plus grand impact aromatique que leurs précurseurs (Belda et al., 2017). Leur synthèse est dépendante de l'espèce et souche de levure impliquée ainsi que de divers paramètres dont les conditions de vinification et la disponibilité en intermédiaires métaboliques (Saerens et al., 2008; Styger et al., 2011; Swiegers et al., 2005). D'après Saerens et collaborateurs (Saerens et al., 2010), la synthèse de ces esters permettrait la régénération de coenzyme A et la détoxification du milieu en évitant l'accumulation de précurseurs toxiques tels que les acides gras à moyenne chaîne et les alcools supérieurs. La concentration en esters atteint son maximum lorsque les levures atteignent la phase stationnaire de croissance (Lee et al., 2004).

Esters acétate

La formation des esters d'acétate est induite par conjugaison d'un alcool supérieur et d'un acétyl-CoA (Figure 17). Différentes enzymes sont impliquées dans la synthèse de ces esters dont les mieux caractérisées chez *S. cerevisiae* sont les alcool acétyltransférases Atf1 et Atf2 (Lilly et al., 2000). Le gène codant pour l'Atf1 est connu depuis des années pour être impliqué dans la formation d'isoamylacétate, de 2-phényléthylacétate, d'hexyl acétate, d'éthyl caproate et d'éthyl acétate (Lilly et al., 2000, 2006). La régulation de ce gène conduit à la modulation du profil ester des vins. En outre, l'activité enzymatique issue de ces régulations est surtout nuancée en fonction des conditions d'oxygénation ainsi que la teneur en acides gras du milieu (Fujii et al., 1997). La teneur en esters du vin résulte d'un équilibre entre l'activité acétyltransférase des enzymes Aat1 et 2 et des estérases également décrites chez *S. cerevisiae* (Lilly et al., 2006; Verstrepen et al., 2003).

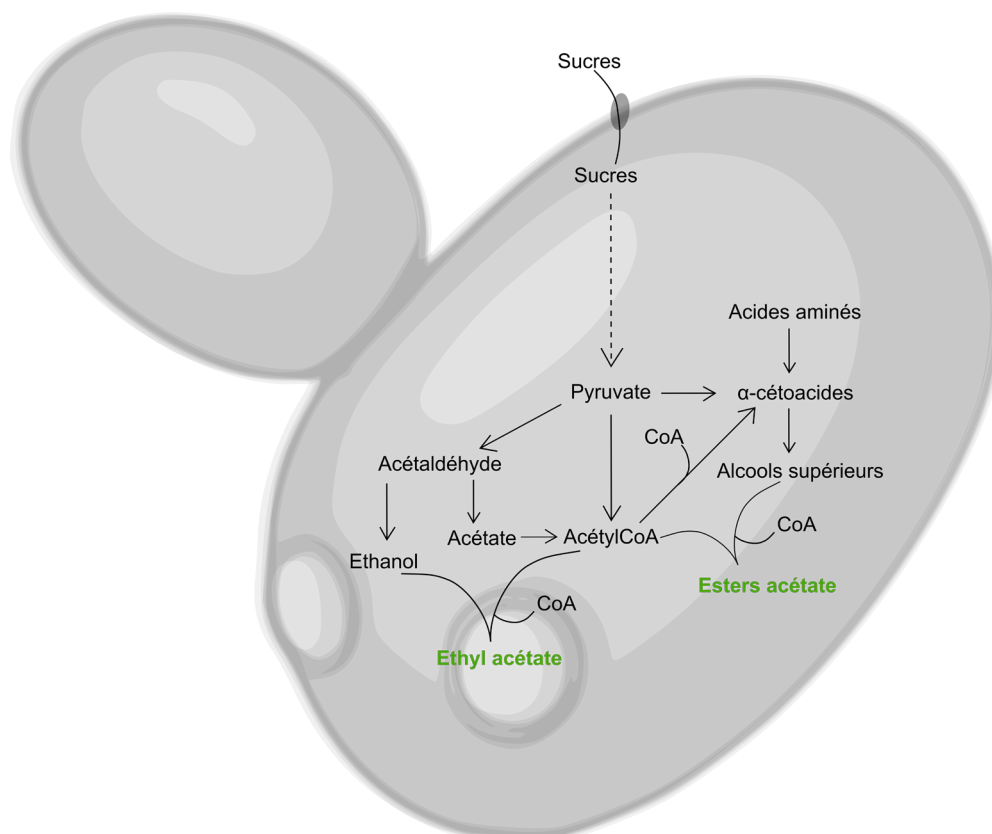


Figure 17 : Voie de biosynthèse des esters d'acétate (adapté d'après Swiegers et al., 2005)

Esters éthyliques d'acides gras

Les esters éthyliques sont, quant à eux, produits à partir d'éthanol et d'acyl-CoA par les éthanol O-acyltransférases Eeb1 et Eht1 (Figure 18). Eeb1 est responsable de la synthèse de la majorité des esters d'éthyle tandis que Eht1 catalyse exclusivement la synthèse d'hexanoate d'éthyle à partir de l'éthanol et d'héxanoyl-CoA. Ces deux enzymes possèdent également une activité estérase participant activement au métabolisme des lipides (Saerens et *al.*, 2006, 2008). Ces esters interviennent moins que les esters acétate dans le profil aromatique des vins et sont souvent associés à des notes de bougie ou de savon.

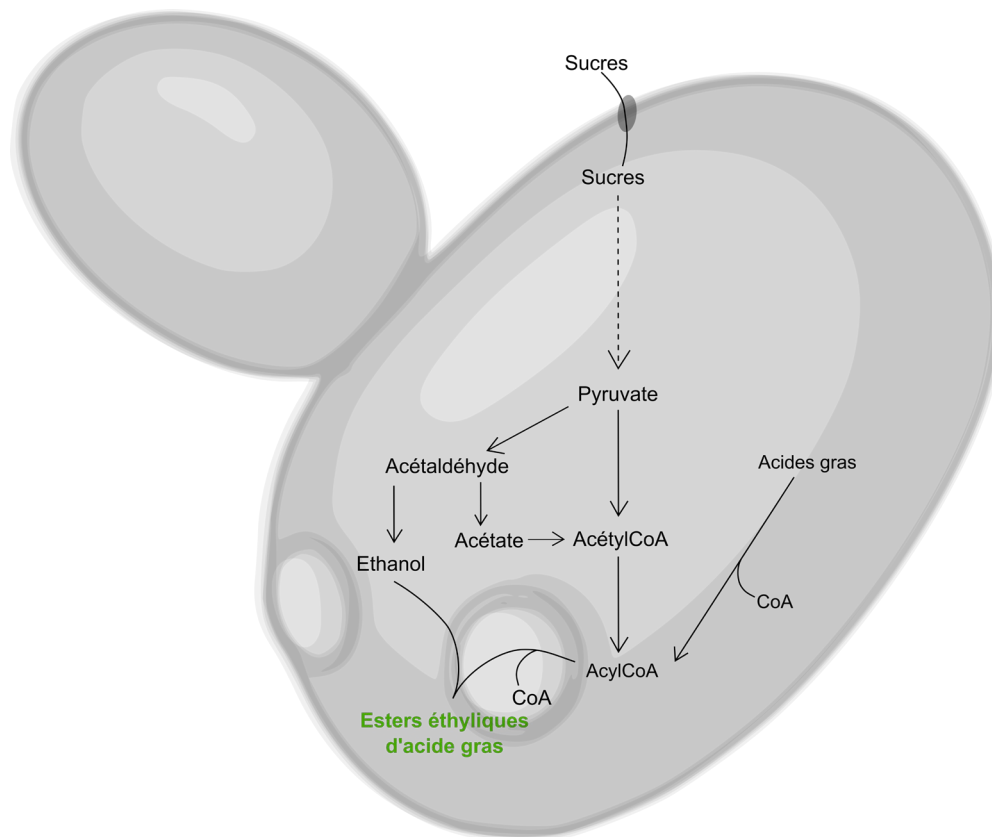


Figure 18 : Voie de biosynthèse des esters éthyliques d'acides gras

Malgré des difficultés à lier les caractères sensoriels à la production de composés volatiles du fait de l'existence de plusieurs substances volatiles responsables d'une même note aromatique, ou encore de la combinaison de substances volatiles donnant des notes différentes de celles attendues des composés individuels, et enfin des différences de perception des substances volatiles dans différentes matrices, la majorité des composés volatiles produits au cours des processus fermentaires contribuent au profil aromatique du vin (Chambers & Koppel, 2013). De plus, la production de ces composés est modulée selon les caractéristiques génétiques et phénotypiques des levures mais également en fonction des conditions environnementales

comme vu précédemment (Partie II). Parmi ces contraintes environnementales, est retrouvée, la coexistence avec différents micro-organismes au cours de la vinification. La présence de ces derniers par le biais d'interactions conduit à une modulation de l'activité métabolique qui impacte le profil aromatique des vins (Fleet, 2003). Les mécanismes d'interactions et leurs impacts sont aujourd'hui largement étudiés et reportés (Comitini et al., 2021; Conacher et al., 2019; Mencher et al., 2021; Zilelidou & Nisiotou, 2021). Toutefois, les techniques d'études sont très hétérogènes et rendent l'élucidation des mécanismes d'interactions complexes. Par ailleurs, la majorité des études s'attachent à décrire les interactions intervenant entre des levures de différents genres.

IV. Interactions au cours de la vinification

Les interactions entre micro-organismes impliqués dans la production de produits fermentés font l'objet de travaux depuis de très nombreuses années. Leur étude a pour objectif majeur d'appréhender les écosystèmes présents dans les différentes matrices en vue d'améliorer les produits fermentés finis. Les interactions sont catégorisées selon différents critères. Elles peuvent être caractérisées selon l'existence d'un contact entre les deux populations en présence (interactions indirectes ou directes) mais également selon l'effet favorable, néfaste ou neutre - d'une population sur l'autre. Enfin, elles sont décrites selon six catégories principales d'interactions microbiologiques exposées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Différents types d'interactions et leurs effets sur les populations en présence (0 : absence d'effet, - : effets délétères sur la population, + effets bénéfiques pour la population)

Types d'interaction		Impact sur les différentes populations	
	Neutralisme	Pas d'effet sur les populations	0 / 0
Interactions indirectes	Compétition	Les deux populations sont affectées négativement	- / -
	Amensalisme	Une des populations est inhibée sans effet délétère pour l'autre	- / 0
	Commensalisme	Une des populations est favorisée sans effet délétère pour l'autre	+ / 0
	Mutualisme	Bénéfique pour les deux populations	+ / +
Interactions directes	Parasitisme	Développement d'une population au dépend de l'autre	+ / 0

Parmi ces interactions, plusieurs mécanismes/phénomènes ont été recensés et décrits en œnologie. Ces derniers ont été reportés par (Ciani & Comitini, 2015) (Figure 19).

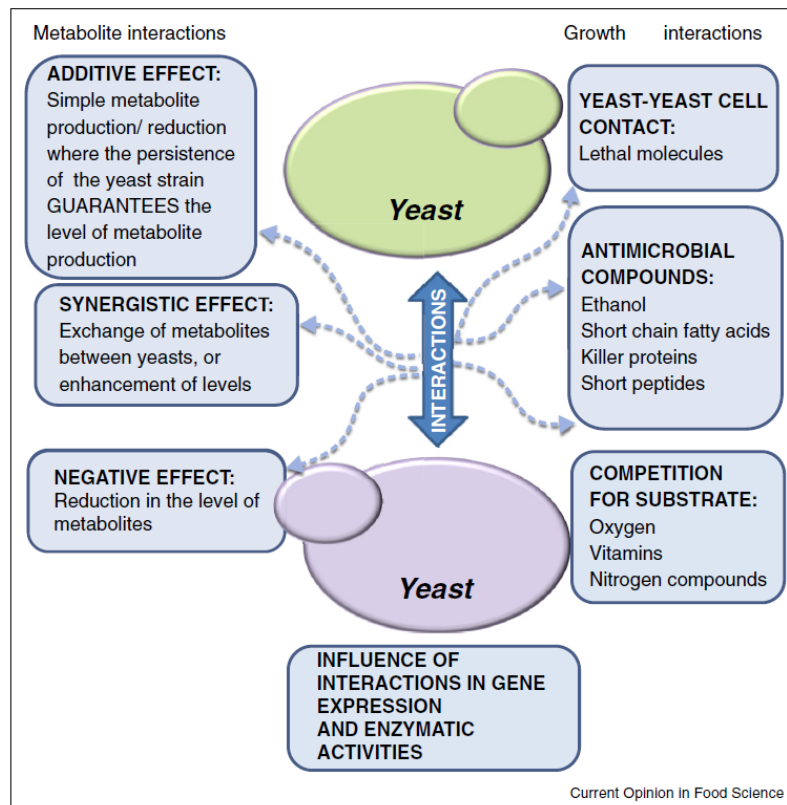


Figure 19 : Schéma illustrant les types d'interactions entre levures rencontrés en vin (Ciani et Comitini., 2015)

Dans cet exposé, seules les interactions entre levures seront abordées.

Comme vu précédemment différents substrats (azote, vitamines, disponibilité en oxygène) sont essentiels à la croissance des levures (Alexandre & Charpentier, 1998). Aussi, des phénomènes d'interactions (positives ou négatives) au regard de la disponibilité et/ou la limitation en nutriments ont été reportés (Ciani et al., 2006, Medina et al., 2012, Ciani and Comitini, 2015, Wang et al., 2015b, 2016, Salvado et al., 2011, Shekhawat et al., 2017).

4.1. Interactions *Saccharomyces* / non -*Saccharomyces*

4.1.1. De la dominance des non-*Saccharomyces*

Les levures non-*Saccharomyces* sont majoritaires en début de vinification. Leur croissance implique ainsi une consommation des nutriments présents dans le milieu rendant indisponibles ces derniers pour *S. cerevisiae*. Les études ont majoritairement abordé la question de l'azote assimilable, élément central du métabolisme levurien comme développé ci-devant (Gobert et al., 2017; Rollero et al., 2018; Taillandier et al., 2014). Lors d'une inoculation retardée de 48h de *S. cerevisiae* dans le cadre d'une fermentation séquentielle avec *Torulaspora delbrueckii*, il a été observé que la croissance de *S. cerevisiae* était ralentie. Ce phénomène est attribué à la faible disponibilité en azote dans le milieu consommé plus tôt par la non-*Saccharomyces*

(Taillandier et al., 2014). Cette observation a également été faite dans des travaux plus récents avec une souche de *Starmerella bacillaris* (Gobert et al., 2017) ou encore avec *Kluyveromyces marxianus* (Rollero et al., 2018). De plus, cette dernière a permis de mettre en évidence grâce à la comparaison entre différents couples de levures *S. cerevisiae* / non-*Saccharomyces* que selon l'espèce de non-*Saccharomyces* mise en présence, différents phénomènes pouvaient être observés. En effet, des interactions neutres du point de vue nutritif ont été mises en évidence entre *Pichia burtonii* / *S. cerevisiae* et une compétition pour d'autres nutriments comme les lipides et vitamines a été évoqué pour le couple *Zygosaccharomyces meyeri* / *S. cerevisiae*. Cette compétition pour les vitamines, bien que peu étudiée avait été évoquée en 1996 par Bataillon et collaborateurs (Bataillon et al., 1996) et confirmé en 2012 (Medina et al., 2012). En outre, l'activité protéolytique de certaines espèces de non-*Saccharomyces* conduirait à une augmentation de la teneur en sources azotées, dans le milieu, alors disponibles pour les autres espèces de micro-organismes (Charoenchai et al., 1997; Dizy & Bisson, 2000).

4.1.2. ... à celle des *Saccharomyces*

La majorité des études ont cependant observé une dominance de *S. cerevisiae* sur les espèces non-*Saccharomyces* dans le cadre de co-cultures. Les levures non-*Saccharomyces* telles que *Hanseniaspora uvarum* et *T. delbrueckii* sont davantage sensibles aux conditions anaérobies imposées par la croissance de la levure *S. cerevisiae*, entraînant une inhibition de leur développement voire leur mort (Hansen et al., 2001; Wang et al., 2015). En effet, comme évoqué dans cet exposé, l'oxygène est nécessaire à la synthèse d'acides gras eux-mêmes impliqués dans la structure de la bicouche lipidique membranaire contribuant à la résistance à l'éthanol dont la concentration augmente au cours de la vinification. En présence de *T. delbrueckii*, Curiel et collaborateurs ont montré en 2017 que, *S. cerevisiae* voyait son activité métabolique stimulée (Curiel et al., 2017). Ces études identifient les gènes surexprimés lors de la mise en présence de deux populations de levures œnologiques. Aussi, une surexpression des gènes sous le contrôle du NCR a été décrite en parallèle de celle de gènes soumis au CCR. Parmi eux, les gènes les plus surexprimés appartenaient à la famille *DAL* proposés comme des marqueurs de limitation en azote ainsi leur expression serait liée au « stress azoté » dans la cellule (Boer et al., 2003; Pizarro et al., 2008). Ces gènes étaient sous le contrôle du facteur de transcription *GLN3* requis pour l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation de sources non préférentielles d'azote. De plus, ces gènes habituellement exprimés en fin de fermentation lorsque la disponibilité en carbone et azote décroît permettent la réduction de la répression catabolique de ces nutriments. En outre, des gènes codant pour des perméases tels que *PUT4*,

GAP1, *UGA4* ou encore pour des transporteurs pour les métaux comme le sulfate (*SUL1*) ou le cuivre (*CTR3*) ont été dégagés. Cette modulation de l'expression tend alors à assimiler les sources nutritives au détriment de *T. delbrueckii*. Des gènes impliqués dans la réplication cellulaire et le maintien de la structure membranaire comme *TIP1* ou encore *OLE1*, *ERG3,5,11,25* engagé dans la composition lipidique de la membrane ont également été surexprimés en présence de *Candida sake*. Cette surexpression corrobore les précédentes conclusions. En augmentant la croissance de la population, et donc sa surface membranaire relative, *S. cerevisiae* tend à devenir majoritaire et donc accroître son assimilation des nutriments présents dans le milieu au détriment des autres espèces (Curiel et al., 2017; Tronchoni et al., 2017).

Aussi, une surexpression du gène *HSP12* proposé comme biomarqueur de la réponse à la présence d'une autre population levurienne ne serait observée qu'en cas de co-culture avec une espèce levurienne qui représente un danger pour sa croissance. Ce danger serait dépendant de la proximité phylogénétique de la souche de non-*Saccharomyces* avec la *S. cerevisiae* dont le transcriptome est étudié. Par ailleurs, en 2015, la modulation de l'expression de 120 gènes chez *S. cerevisiae* due à l'association d'une souche de *Hanseniaspora guilliermondii* a été observée par l'équipe de Barbosa et collaborateurs (Barbosa et al., 2015). La plupart était rapporté pour participer à la biosynthèse des acides aminés, l'assimilation et le catabolisme d'acides aminés spécifiques ou encore la biosynthèse de vitamines. En effet, la présence de *H. guilliermondii* entraînerait une moins bonne assimilation des composés disponibles dans le milieu en début de fermentation. Ce phénomène est soulevé par une transcription moins élevée de gènes soumis au NCR comme *MEP1* ou *MEP2* codant pour des perméases spécifiques à l'assimilation d'ammonium. A l'inverse des gènes comme *THI20* et *THI21* dont la régulation est soumise à la disponibilité en thiamine dans le milieu, ou encore *PHO3* impliqué dans son assimilation, ont présenté des niveaux d'expression significativement supérieurs en co-culture, suggérant une compétition pour la thiamine, cofacteur essentiel pour l'activité de la pyruvate décarboxylase, entre les deux populations. En outre, cette compétition pour la thiamine et son appauvrissement dans le milieu conduit à une réduction du rendement fermentaire et une augmentation de la teneur en glycérol du vin. Une activation de facteurs de transcription, tel que *Adr1*, impliqués dans l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation de sources non préférentielles de carbone a également été notée (Barbosa et al., 2015).

La production de composés extracellulaires serait également impliquée dans des mécanismes d'interaction dits d'amensalisme a largement été dépeinte (Albergaria & Arneborg, 2016;

Branco et al., 2014; Ciani et al., 2000; Perez et al., 2001; Pereznevado et al., 2006; Velázquez et al., 2015; C. Wang et al., 2015). Les produits issus du métabolisme de *S. cerevisiae* peuvent révéler une action inhibitrice sur la croissance de l'espèce qui lui est associée ou encore une action pouvant induire une modification de son métabolisme. Parmi les plus cités on retrouve : l'éthanol et les acides gras à moyenne chaîne.

L'éthanol est décrit comme un des principaux produits du métabolisme de *S. cerevisiae* inhibiteur de la croissance des non-*Saccharomyces*. Les non-*Saccharomyces* ont été dépeintes comme intolérantes à de grandes concentrations d'éthanol (> 5-7% v/v) qui deviendrait toxique pour ces dernières (Fleet, 2003; Heard & Fleet, 1986). Cependant, des études plus récentes tendent à discuter ce point, certaines souches de non-*Saccharomyces* étant très tolérantes à l'éthanol (Albergaria et al., 2003; Combina et al., 2005; Pereznevado et al., 2006; Pinu, Edwards, Gardner, et al., 2014). En outre, couplé avec d'autres facteurs tels que la température, ou la présence d'acides gras, l'éthanol se trouve contribuer à la dominance de *S. cerevisiae* (Gobbi et al., 2013; Goddard, 2008; Salvadó et al., 2011).

Ces acides gras s'avèrent être également toxiques pour la cellule en cas d'importantes concentrations. Les acides gras à moyenne chaîne, comportant de 6 à 14 atomes de carbone produit par la levure en conditions fermentaires peuvent mettre à mal la stabilité membranaire et entraîner la mort de la cellule (Alexandre et al., 1994; Bisson, 1999; Ludovico et al., 2002; Salmon et al., 1998).

D'autres composés toxiques et/ou antimicrobiens ont été mis en évidence dans le cadre de co-cultures. Des toxines extracellulaires peuvent être produites par certaines souches de levures dites « killer » pouvant induire la mort d'une autre souche dite « sensible ». Ces toxines sont des composés protéiques et peptidiques produits aussi bien par des levures de l'espèce *S. cerevisiae* que des non-*Saccharomyces*. Elles sont décrites pour impacter la dynamique de population au cours des procédés fermentaires (Ciani & Comitini, 2015; Fleet, 2003). Différents composés toxiques ont été découverts au cours des études relatives aux interactions. Aussi, en 2006, Pérez-Novado et collaborateurs mettent en évidence un phénomène killer exercé par la souche *S. cerevisiae* CCMI85 responsable de la mort précoce de *H. guilliermondii* (Pereznevado et al., 2006). Cette souche se révèle plus tard, productrice d'un peptide antimicrobien de 10 kDa causant ce phénomène (Albergaria et al., 2010). La nature de ce peptide a ensuite été examinée par Branco et collaborateurs. Ces derniers ont montré que le peptide était en réalité un dérivé de la glycéro-3-phosphatase déshydrogénase (Branco et al.,

2014). La production de ce peptide a été décrite pour être associée à un autre mécanisme d'interaction qu'est le contact cellule-cellule (Kemsawasd, Viana, et al., 2015).

Les levures non-*Saccharomyces* sont aussi reconnues pour produire ce type de composés antimicrobiens (Comitini et al., 2004; Oro et al., 2014; Santos et al., 2009). Deux toxines, Pikt1 et Kwkt produites par *Pichia anomala* et *Kluyveromyces wickerhamii* ont été décrites comme étant actives contre les levures du genre *Brettanomyces* (Comitini et al., 2004). Dans un autre registre, *Metschnikowia pulcherrima* semble par la production d'acide pulchérique, composé non protéique, inhiber les autres populations en présence, en déplaçant le milieu en fer (Oro et al., 2014; Sipiczki, 2006).

Ces interactions sont étroitement liées avec le phénomène de contact cellule-cellule ou cell-cell contact (Albergaria & Arneborg, 2016). En 2003, Nissen et al., montre pour la première fois l'existence de ce phénomène en vinification (Nissen et al., 2003). En effet, les auteurs décrivent un phénomène de mort précoce de levures non-*Saccharomyces* lors d'un contact avec une souche de *S. cerevisiae* dans le cadre d'une compartimentation des espèces mises en jeu pendant la fermentation alcoolique. L'étude a mis en évidence que lors d'une co-fermentation avec compartimentation, les souches non-*Saccharomyces* présentaient des croissances équivalentes à des cultures pures contrairement à la co-culture sans compartimentation avec *S. cerevisiae*. Renault et collaborateurs, confirmeront cet effet par l'utilisation d'un fermenteur à double chambre avec la même souche de *T. delbrueckii* que Nissen (Renault et al., 2013). Ce type d'étude a été également mené par (Englezos et al., 2019; Kemsawasd, Branco, et al., 2015; Luyt et al., 2021) avec différentes souches de non-*Saccharomyces* montrant les mêmes résultats. Cependant, Petitgonnet et collaborateurs (Petitgonnet et al., 2019) ont pu mettre en évidence le schéma inverse avec une *L. thermotolerans* ayant un impact délétère sur le développement et les performances de *S. cerevisiae*. Ces phénomènes de cell-cell contact ont pu être largement décrits, néanmoins les mécanismes impliqués dans ces derniers restent à ce jour peu étudiés.

Enfin, un procédé de communication cellulaire impliquant des molécules signal de faible poids moléculaire, autrement défini comme Quorum Sensing (QS) a été suggéré. Ce procédé est largement exposé chez les bactéries notamment dans la formation de biofilm ou la production de certaines enzymes (Miller, 2001; Yashiroda & Yoshida, 2019). La concentration en molécules signal produites pendant la phase de croissance des microorganismes atteint une valeur seuil induisant une réponse de la cellule réceptrice telle qu'une inhibition ou activation de gènes. Ce comportement a également été décrit chez des levures pathogènes comme

Histoplasma capsulatum (Kugler et al., 2000) ou encore *Candida albicans* dans le cadre de la formation de biofilms (Ramage et al., 2002) avec pour molécules signales des alcools supérieurs (2-phényléthanol, tryptophol et le tyrosol) (Avbelj et al., 2016).

En 2006, Chen et Fink, décrivent ce phénomène de communication cellulaire médié par des alcools aromatiques, pour la première fois, chez l'espèce *S. cerevisiae* (Chen, 2006). Le 2-phényléthanol et le tryptophol, dérivés de la phénylalanine et du tryptophane par la voie de Ehrlich, sont alors décrits comme des molécules de QS, sont synthétisés dans des conditions de faible teneur en azote (Hazelwood et al., 2008; Wuster & Babu, 2009), tandis que le tyrosol présente peu d'effet sur cette espèce. La synthèse de ces alcools aromatiques serait médiée par la densité cellulaire par contrôle de l'expression des gènes *ARO9* et *ARO10* codant pour des transaminases impliquées dans le catabolisme des acides aminés aromatiques (Chen, 2006). En outre, leur synthèse serait à l'origine de la stimulation de la du gène *FLO11* codant pour une flocculine impliqué dans la croissance filamenteuse (Jin et al., 2008). Aussi, ces molécules signal pourraient être impliquées dans la mort précoce de levures non-*Saccharomyces* durant la vinification (González et al., 2018). Depuis quelques années le quorum sensing fait l'objet d'études plus poussées en conditions fermentaires. Différentes équipes ont montré une production accrue d'alcools supérieurs en tant que molécules signal comme cité précédemment lors de co-culture de levures *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces* en conditions de carence en azote (González et al., 2018; Varela et al., 2018; Zupan et al., 2013). Différentes molécules signales ont également été suggéré pour participer au QS comme l'ammonium, le bicarbonate ou encore l'acétaldéhyde (Fleet, 2003). L'émission de gaz dont l'ammonium a également été décrite pour participer à une communication cellulaire de longue distance lors de développement de *S. cerevisiae* en surface comme les colonies sur milieu de culture gélosé. Ce signal servirait donc de guide pour les colonies voisines afin de minimiser la compétition pour les nutriments (Mencher et al., 2021; Palková et al., 2002; Yashiroda & Yoshida, 2019). Aussi, l'acétaldéhyde a été dépeinte pour comme un composé signal permettant de synchroniser les oscillations glycolytiques de *S. cerevisiae*.

Des structures plus importantes seraient également impliquées dans la communication cellulaire selon un phénomène contact indépendant, les vésicules extracellulaires. Ces structures présentant une bicouche lipidique et pouvant prendre en charge dans leur lumière des protéines ou encore des acides nucléiques sont décrites par la plupart des organismes vivants (Théry et al., 2018) et interviendraient dans des processus de communication inter et intra spécifiques (Rodrigues & Casadevall, 2018).

4.2. Interactions *Saccharomyces* / *Saccharomyces*

Manifestement, les interactions entre levures en conditions fermentaires sont largement étudiées. Cependant, ces dernières concernent majoritairement les interactions intervenant entre des levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*. Il existe néanmoins des phénomènes d'interaction entre des levures du même genre ou encore de la même espèce à savoir *Saccharomyces*. Leur étude est en revanche moins répandue. Aussi, peu de littérature s'y consacre.

La première interaction entre deux souches de *S. cerevisiae* a été révélée en 1963 par Bevan et Makower. Cette dernière faisait intervenir une killer toxine, mécanisme précédemment cité. Ce même processus a plus récemment été rapporté, montrant l'importance du choix du ferment inoculé dans le cadre de fermentations maîtrisées (Capece et al., 2013). En effet, la souche inoculée doit pouvoir compléter les souches indigènes au moût. Aussi, ces études ont montré que certaines souches commerciales étaient inhibées par ces levures indigènes arborant un caractère killer. D'autres équipes ont mis en évidence que l'implantation des souches commerciales pouvaient se révéler compliquée (Barrajón et al., 2009; Heard & Fleet, 1986; Lopes et al., 2007). En effet, tout comme pour les autres micro-organismes, il existe une compétition pour l'espace et les nutriments entre différentes espèces du même genre ou même souches de *S. cerevisiae*.

Cet amensalisme a été décrit en 2005 par Pommier et collaborateurs entre deux souches de *S. cerevisiae* présentant des phénotypes killer opposés dans un contexte de séparation spatiale en bioréacteur double chambre. Une toxine de type K2 produite par la souche killer induisait la mortalité de la souche sensible à la suite d'une phase de latence (Pommier et al., 2005).

D'autre part, un mécanisme d'interaction positif a été observé entre une souche de *S. cerevisiae* et un hybride de *S. cerevisiae* et *Saccharomyces uvarum* résultant en une augmentation de la croissance de la souche de *S. cerevisiae*. En effet, la souche hybride produisait une importante quantité d'acétaldéhyde favorable à l'autre population par variation du potentiel redox des cellules en comparaison avec la culture pure. Cette réponse à la présence en acétaldéhyde croissante induirait une réponse au stress de la souche de *S. cerevisiae* par augmentation de l'expression des gènes *HSP* codant pour une aldéhyde déshydrogénase permettant l'utilisation de l'acétaldéhyde comme source de carbone et énergie (Cheraiti et al., 2005).

Un autre mécanisme cité précédemment a été également observé entre différentes souches de *S. cerevisiae* : le cell-cell contact. En 2013, différentes souches de *S. cerevisiae* indigènes ont été isolées d'un moût de Nebbiolo (Perrone et al., 2013). Cette étude visant à déterminer les mécanismes de dominance de *S. cerevisiae* pendant la fermentation alcoolique, incluait une caractérisation génétique des souches isolées. Ces dernières exhibaient un dimorphisme génétique du gène *SEDI* codant pour des protéines membranaires. Cette différence a été suggéré comme liée au caractère dominant ou non dominant des souches et utilisée comme outil pour étudier les phénomènes d'interactions. Des couples de souches présentant des caractères, dominant ou non, ont été formés et mis en culture selon deux modalités : en mélange ou en bioréacteur à deux compartiments séparés par une membrane laissant passer le milieu de culture. Aussi, il a été observé qu'en mélange les souches non-dominantes étaient inhibées tandis que lorsque les cellules étaient cultivées séparément dans le bioréacteur les deux souches persistaient, indiquant l'implication du cell-cell contact dans le phénomène de dominance (Perrone et al., 2013). Cette étude a donné lieu à une exploration de ce même phénomène entre deux souches de *S. cerevisiae* selon une approche transcriptomique (Pérez-Torrado et al., 2017). Cette dernière a permis de mettre en évidence l'expression de gènes tels que *BSC1*, *TIP1* impliqués dans la structure de la membrane cellulaire participant aux propriétés d'adhésion de la cellule et conférant des avantages pour la souche dominante. A l'inverse, la souche sensible présentait une surexpression de gènes dont *CMK2*, *PHO84*, *PST1* appartenant à la voie de signalisation de la calmoduline. Cette surexpression serait décrite pour être associée à une réponse au stress cellulaire ainsi qu'à d'éventuels dommages cellulaires subis par la cellule suite à la mise en contact avec la souche dominante. Ce phénomène de contact cellule-cellule avait également été observé par Arroyo-Lopez et al., 2011 entre deux différentes espèces appartenant au genre *Saccharomyces* : *S. cerevisiae* et *S. kudriavzevii* (Arroyo-López et al., 2011).

En parallèle de l'étude des mécanismes impliqués dans les interactions entre micro-organismes, des études ont été menées pour décrire l'impact de ces interactions sur la matrice (Alonso-del-Real et al., 2017; Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2006; Gustafsson et al., 2016; Howell et al., 2006; King et al., 2008). En effet, Howell et collaborateurs, en 2006, vérifient et confirment qu'il existe des interactions entre différentes souches de *S. cerevisiae* et *Saccharomyces bayanus*, en comparant des co-cultures avec les cultures pures correspondantes et des assemblages des vins issus des fermentations individuelles. Une analyse des composés volatiles a été réalisée par Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-

MS) mettant en évidence des profils aromatiques distincts entre les différents mix selon les souches mises en jeu. Aussi, cette information indiquerait que l'activité métabolique de chacune des souches a impacté le bilan métabolique du mix. Enfin, une comparaison des mix et des assemblages post fermentaires a permis de confirmer qu'il existait bien une interaction, entre les différentes levures, associée avec une modification métabolique de celles-ci. Assurément, le profil aromatique des cultures mixtes ne résulte pas uniquement d'une addition de la synthèse de composés volatiles par chacune des levures (Howell et *al.*, 2006). Des études similaires ont été menées sur différentes matrices : Sauvignon Blanc (King et *al.*, 2008), moût synthétique (Barrajón et *al.*, 2011), Sangiovese (Capece et *al.*, 2013) et ont permis de tirer des conclusions similaires.

Nous avons pu voir au cours de ce propos que les interactions étaient médiées par différents mécanismes mais aussi que les conditions expérimentales et le matériel biologique jouaient un rôle essentiel dans ces phénomènes. Aussi, nous avons souhaité développer cet aspect dans la revue : *Yeast–Yeast Interactions : Mechanisms, Methodologies and Impact on Composition* publiée en 2020 dans le journal *Microorganisms*. Cet état de l'art retrace les différentes méthodologies d'étude utilisées pour caractériser tous ces mécanismes d'interaction. Aussi, un exposé est réalisé quant aux différents impacts de ces interactions sur la matrice finale.

[4.3. Yeast–Yeast Interactions : Mechanisms, Methodologies and Impact on Composition](#)

Au cours du processus de vinification, la fermentation alcoolique est réalisée par un consortium de levures au sein duquel se produisent des interactions. Les conséquences de ces interactions sur la matrice du vin sont largement décrites depuis plusieurs années dans le but de maîtriser au mieux le processus de vinification. Dans cette revue, nous mettons en évidence la grande diversité des méthodologies utilisées pour étudier ces interactions, ainsi que leurs mécanismes sous-jacents et leurs conséquences sur la composition et les caractéristiques finales du vin. La grande variété des paramètres de matrice, des couples de levures et des conditions de culture a conduit à des contradictions entre les résultats des différentes études considérées. Les aspects plus récents des modifications de la composition de la matrice sont abordés à travers différentes approches qui n'ont pas fait l'objet d'une synthèse récente. Des approches de métabolomique non volatile et volatile, ainsi que d'analyse sensorielle sont décrites dans cet article. La description de la modification de la composition de la matrice ne semble pas suffisante pour expliquer les mécanismes d'interaction. Il est donc indispensable d'adopter une approche intégrée pour en tirer des conclusions définitives.



microorganisms

an Open Access Journal by MDPI



Yeast–Yeast Interactions: Mechanisms, Methodologies and Impact on Composition

Fanny Bordet; Alexis Joran; Géraldine Klein; Chloé Roullier-Gall; Hervé Alexandre

Microorganisms 2020, Volume 8, Issue 4, 600

Received: 02 April 2020; Accepted: 16 April 2020; Published: 20 April 2020

Yeast–Yeast Interactions: Mechanisms, Methodologies and Impact on Composition

Fanny Bordet 1,2,†, Alexis Joran 1,†, Géraldine Klein 1, Chloé Roullier-Gall 1, Hervé Alexandre 1*

1 Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMRA 02.102, F-21000 Dijon, France-IUVV Equipe VAlMiS, rue Claude Ladrey, CEDEX BP 27877, 21078 Dijon, France; bordetfanny@gmail.com (F.B.); alexis.joran@gmail.com (A.J.); geraldine.klein@u-bourgogne.fr (G.K.); Chloé.Roullier-Gall@u-bourgogne.fr (C.R.-G.)

2 Lallemand SAS, 19, rue des Briquetiers, CEDEX BP 59, 31702 Blagnac, France

* Correspondence: rvalex@u-bourgogne.fr; Tel. : +33-380-396-393

† These authors contributed equally to this work.

Abstract:

During the winemaking process, alcoholic fermentation is carried out by a consortium of yeasts in which interactions occurs. The consequences of these interactions on the wine matrix have been widely described for several years with the aim of controlling the winemaking process as well as possible. In this review, we highlight the wide diversity of methodologies used to study these interactions, and their underlying mechanisms and consequences on the final wine composition and characteristics. The wide variety of matrix parameters, yeast couples, and culture conditions have led to contradictions between the results of the different studies considered. More recent aspects of modifications in the composition of the matrix are addressed through different approaches that have not been synthesized recently. Non-volatile and volatile metabolomics, as well as sensory analysis approaches are developed in this paper. The description of the matrix composition modification does not appear sufficient to explain interaction mechanisms, making it vital to take an integrated approach to draw definite conclusions on them.

Keywords: yeast–yeast interactions; wine; mixed culture; methodologies; fermentation conditions; omics; sensory

1. Introduction

The transformation of grape must into wine is a complex process involving various microorganisms: yeasts, molds, and bacteria. The main step, alcoholic fermentation, is performed by yeasts. In natural fermentation, microflora comes from grape berries but also from winery equipment and surroundings. Yeast biodiversity on grape berries is governed by various biotic and abiotic factors such as grape variety, climatic conditions and viticultural practices [1,2,3]. Yeasts present on grapes are mainly from non-*Saccharomyces* genera (essentially *Hanseniaspora*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Cryptococcus* and *Rhodotorula* [3]) while *Saccharomyces* genera are very rare. However, although non-*Saccharomyces* yeasts initiate fermentation and develop during the first hours, their population declines rapidly in favor of *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), which becomes the dominant species until the end of alcoholic fermentation. The evolution of yeast populations during fermentation seems to be linked to several modifications that make the medium more selective. The establishment of nutrient depletion, anaerobic conditions, increased acidity, the production of sulfur dioxide, and increasing levels of ethanol (up to 15%v/v) results in a drop in yeast diversity [2]. This modification of the matrix environment allows the survival of *S. cerevisiae* because of its overall better resistance to stress compared to non-*Saccharomyces* species [4].

Producers have used wine starters for many decades to ensure proper fermentation initiation and the quality and reproducibility of wine. Indeed, starter yeasts allow efficient fermentation management that limits contaminations and avoids deviations due to interrupted or sluggish fermentations [5]. These starter yeasts are selected for their specific metabolic properties: resistance

to various stresses, fermentation capacity, or the presence of enzymatic activities [6]. The ability of *S. cerevisiae* to grow in a selective medium as described above, to carry out efficient and quick alcoholic fermentations, make this species a tool of choice as an oenological starter [5].

However, in recent years, non-*Saccharomyces* yeasts have been used for wine production since several yeast species have shown high oenological potential [7,8]. Indeed, yeasts like *Saccharomyces non-cerevisiae* [9,10], non-*Saccharomyces* [6,7,11,12,13,14,15,16], and even natural hybrids [17,18,19,20,21] are of interest, because their different metabolisms compared to *S. cerevisiae* brings diversity to quantitative and qualitative composition of final wine (for example, ethanol content, organic acids, aroma production) [3,22,23]. Nevertheless, all these studies show that the utilization of these yeasts, in combination with *S. cerevisiae*, as wine starters, is still a challenge, since the results are unpredictable and lack of reproducibility. The conduct of fermentations by managing the simultaneous or successive implantation of different strains to obtain the desired impacts on wine has not yet been mastered. It is therefore necessary to understand the phenomena involved in the evolution of the yeast ecosystem during

alcoholic fermentation, to control these mixed cocultures more efficiently. In recent years, numerous researchers have furthered research in understanding interaction mechanisms between microorganisms, since these interactions impact not only the population dynamics but also the metabolism of each strain, with consequences on the compounds produced, and eventually on final wine quality.

Authors have shown the existence of different interaction mechanisms between yeasts: competition for nutrients, the production of inhibitory or toxic compounds, the modification of metabolism by a quorum-sensing answer or induced by cell-contact. But all these results highlight that yeast interactions during wine alcoholic fermentation are very complex because of the variations according to yeasts (species, strain), medium composition, and abiotic conditions (oxygen, temperature). These fickle results (as described in a recent review from Conacher *et al.* (2019) [24]) seem to be linked to the sheer diversity of the methodologies employed. Each team often works with different strains including commercial and indigenous strains, different types of culture media, various matrixes (synthetic must or musts from different grape varieties) and also different culture modalities. Each of these factors can impact the population and fermentation dynamics, by tipping the balance of a fragile equilibrium between species one way or another. Despite the great need for an overview of these methodological differences, so far none is available, although it would lead to better comparisons of results, and provide a synthesis of standard protocols for newcomers in the field.

The objective of this review is to highlight recent scientific developments concerning yeast-yeast interactions. First, the different methodologies employed will be discussed, including recent contributions from transcriptomic and metabolomic approaches. The impact of interactions on volatile and non-volatile composition will then be considered. Finally, the consequences of interactions on wine sensory characteristics will be discussed in-depth.

2. Methodologies

2.1. Parameters: Inoculation and Culture Conditions

Numerous studies have been performed on mixed cultures between *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* to understand how yeast interactions can impact wine quality. Authors have monitored population dynamics, fermentation parameters, metabolite production, especially aroma compound production, and highlighted interaction mechanisms. But contradictory results can be found in this field, as shown in Tables 1 and S1, which include the conditions and results of experiments for several couples of yeasts, those most studied to improve wine quality

Table 1. Diversity of methodologies and results in *S. cerevisiae* / *Lachancea thermotolerans* interaction experiments

Species		<i>S. cerevisiae</i> / <i>Lachancea thermotolerans</i>																																					
		Synthetic Medium										Grape Juice / Must (Unspecified Color)																											
Matrix		SGJ		WYPD		SGJ		WYPD		SGJ		Grape Juice			Grape Must			Grape Must																					
Sugar Initial Concentration (g ⁻¹)		210 (Glc)		200 (Glc)		210 (Glc)		200 (Glc)		200 (Glc 100 Fru 100)		162			160			231																					
YAN / PAN (mg ⁻¹)																		PAN 154 / NH3 22																					
Temperature (°C)		25		25		25		25		25		25			20			25																					
Oxygen		+/-		+/- +		+/-		+		- + ++ +++		+/- +		+			-																						
Inoculation Delay between two Strains (h)		0		0		0		0		0		0		0		0		24		48		72		0															
Ratio Sc/NS		1:1		1:1		1:1		1:1		1:10		1:1		1:1		1:1						1:1		1 :100		1 :1000													
Sc population	Max	2		1		1		2		1		1		3		3		3		3		2		2		1		5		7		7		2		4		15	
	Dominance	+		=				+		+1		+1		+								+		+		+1		+2		+7		+12		+1		+10		+15	
	Decrease	-		2.5		2.5		-		-		-		-		3		3		3		6		-		-		-		-		-		-		-		-	
NS Population	Max	2		1		1		2		1		1		1		1		1		2		2		3		2		5		3		1		3		3			
	Decrease	3		2.5		2.5		3-6		1		1		-		-		-		-		3		4		3		6		10		3		10		15			
	Detectable End	Low 6						Low 6-10		No 6		Low 6 /Yes										Low 4		Low 6		No 7		No 8		Low 8 No 30		Low 30		No 15		No 22		No 22	
Fermentation Completion		10				10		6		5										10		10		+		+		+		+		+							
Ethanol												=		--		--		--						--		--		--		=		--							
Glycerol												++		--		--		--						=		++		++		++		++		++					
Organic Acids	TA																							++		++		++		++		++							
	VA																							--		--		--		--		--							
	LA																							++		++		++		++									
	AA																																						
Impacting Factors												OX / SPE		OX		DEL			RAT / SPE																				
Interaction Mechanisms		No TOX / No COMP / CCC		No TOX / No COMP / No QS / CCC		COMP		TOX / CCC		COMP		COMP		No TOX / COMP																									
Reference		[25]		[26]		[27]		[28]		[29]		[30]		[31]			[32]																						

Species		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / <i>Lachancea thermotolerans</i>										
		Red Grape Juice / Must										
Matrix		Sangiovese - Cabernet Sauvignon 1:1		Sangiovese		Tempranillo	Tempranillo	Shiraz	Tempranillo	Tempranillo	Pinot Grigio	
Sugar Initial Concentration (g ^{l-1})		254		222		249	226	280 (Glc 140 Fru 140)	245	226	236	
YAN / PAN (mg ^{l-1})		PAN 160 / NH ₃ 36				PAN 167	PAN 241	YAN 170 (supp)	YAN 181	PAN 333	YAN 235	
Temperature (°C)		20	30	25		20	25	25		25	22	
Oxygen		++		+		+	-	++	+	+	+	
Inoculation Delay between two Strains (h)		0		0	48	96	96	96	72	72	48	
Ratio Sc/NS		1:10		1:10	1:10	10:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	
Sc Population	Max	4	1	4	7	6	8					
	Dominance	-										
	Decrease	-	-	4	7	-	-	-		-	-	
NS Population	Max	4	4	2	2	4	4					
	Decrease	18	4	4	4	4	4	+	+	5	3	
	Detectable End		No 7	Low 10	Low 10	No 8	Low 10	No 7	No 6		Low 5	
Fermentation Completion		24	13			12	10	17			14	
Ethanol		--	=	--	--	--	-	=	--	--	--	
Glycerol		++	+	++	++	++	++		+	=	++	
Organic Acids	TA	++	++	++	++							
	VA	+	--	++	++			++	= or ++			
	LA	++	+	++	++		++			++	+/-	
	AA					--	--			--	++	
Impacting Factors		TEMP / DEL / GRA / REAC							SPE	SPE		SPE / NS
Interaction Mechanisms												
Reference		[33]					[34]	[35]	[36]	[37]	[13]	[14]

Species		Saccharomyces cerevisiae / Lachancea thermotolerans																								
		White Grape Juice / Must																								
Matrix		Grape must			Riesling			Emir			Airen		Sauvignon Blanc		Airen + Catechin Addition		chardonnay		Riesling		Pedro Ximenez / Sun-Dried			Grape Must		
Sugar Initial Concentration (g^{l-1})		224			237			205			245		217		234		218		225		487			212		
YAN / PAN (mg^{l-1})		PAN 154 / NH3 22			PAN 147						PAN 177		YAN 170 (supp)						YAN 250 (supp)					251		
Temperature (°C)		25			20			18			25		15		25				20		22			20		
Oxygen		-						+			+		+		-		- ++		+		+			+		
Inoculation Delay between two Strains (h)		0	24	48	48			0	24	48	72	0	96	96		168		0		48		0			24	
Ratio Sc/NS		1:10	1:10	1:10	10:1			1:1				1:2,5	1:2	1:1		1:1,3		1:10		1:1	1:5	1:20	1:50	1:1		
Sc Population		Max		2	1	2	4			4				4	8			4	2	4					3	
		Dominance		+11	-	-				+																+
		Decrease		-	-	-	-			6	6							6 6		14					-	
NS Population		Max		1	2	2	2			4	6			4				0	6	0		6	6	6	1	
		Decrease		11			2			4	6			+	4	+	+ or -		4	6	4		-	-	-	5
		Detectable End		Low 18			No 15			Low 7	Yes				No 6	No 8	No 14		No 6	No 8	No 6					
Fermentation Completion		+	-	-	+			7	9			10	14	19				10	12	+		-	-	-	16	
Ethanol		--	--	--	-			=	--					=	=	=		=	--	=		--	--	--	--	
Glycerol		+	++	++	++									-	++			=	=	++		--	--	--		
Organic Acids		TA		++	++	++	++			++	++							--		=						
		VA		--	--	--				++	+++							--								
		LA		++	++	++	+							++	+++			++								
		AA					=							=	--			-		=		=				
Impacting Factors		TEMP / DEL / GRA / REAC			SPE			DEL					SPE		MED		OX / SPE		DEL		RAT					
Interaction Mechanisms																	COMP							CCC / COMP		
Reference		[37]			[38]			[39]			[40]		[41]		[42]		[43]		[44]		[45]			[46]		

YAN = yeast assimilable nitrogen / PAN = primary amino nitrogen. Sc = *S. cerevisiae* / NS = *Non-Saccharomyces*. TA = total acidity / VA = volatile acidity / LA = lactic acid / AA = acetic acid. SGJ = Synthetic Grape Juice / Glc = Glucose / Fru = Fructose / WYPD = Yeast Peptone Dextrose medium modified for wine fermentation / Supp = with supplementation. Oxygen : - = anaerobia, +/- semi-anaerobia, low oxygenation, + = semi-anaerobia, ++ aerobia, +++ aerobia, with higher oxygenation. Population columns : Max = maximal population reached by day x / Dominance : + = dominance of *S. cerevisiae*, = similar populations, "x" = dominance obtained after x days / Decrease = decrease since day x / Low = low population since day x / No = population not detectable since day x / Yes = population still detectable at day x. Fermentation completion : x = reached at day x, +/- = reached/not reached during experimentation. Ethanol, glycerol and organic acids are compared to Sc pure culture : +++ very high increase, ++ high increase, + increase, +/- slight decrease, = no change, - decrease, -- high decrease.

Impacting factors : inoculation delay (DEL), inoculation ratio between *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast (RAT), yeast species (SPE), yeast strain *S. cerevisiae* (SC) or non-*Saccharomyces* (NS), medium composition (MED), grape nature (GRA), temperature (TEMP), oxygenation (OX), type of reactor (lab, pilot, industrial) (REAC). Interaction mechanisms : involvement of quorum sensing mechanisms (QS), toxic compounds (including ethanol, antimicrobial peptides) (TOX), competition for nutrient (including oxygen) (COMP), cell-cell contact mechanisms (CCC) / No = mechanism involvement has been ruled out by the study.

Variability in population dynamics results can be observed depending on the various studies. The *S. cerevisiae* population is not affected in most experiments by the presence of another yeast, even if some exceptions exist [12,29,39,46,47]. On the other hand, the presence of *S. cerevisiae* usually negatively impacts non-*Saccharomyces* growth and early decline and even early death are often observed, but some authors have observed the stability of non-*Saccharomyces* yeasts during a longer period [33,45]. Fermentation kinetics can also be different. Mixed cultures with non-*Saccharomyces* yeasts can lead either to complete fermentations (within different timeframes) [48,49], or to incomplete fermentation [12,33]. The production of metabolites such as glycerol, acids, and aroma compounds is also variable [31,33].

Yeasts are often inoculated at a cell count of 10^6 cells.ml⁻¹ since this corresponds to the conditions occurring in natural fermentation [50], in which there is dominance of non-*Saccharomyces* populations at the early stage, but inoculation density can vary between 5.10^4 [26] and 2.10^7 cells.ml⁻¹ [29,51].

The first hypothesis to explain this diversity of results is medium composition, which is known to impact yeast physiology, metabolism, and yeast interactions. Tables 1 and S1 show that numerous authors choose to use real grape juice or must to approach winemaking conditions. But natural grape must is not standardized and its composition varies depending, for example, on the year, harvest time, and grape variety. Englezos et al. (2016) [12] and Nisiotou et al. (2018) [49] both conducted mixed fermentation with *Starmerella bacillaris* (*S. bacillaris*) in similar conditions (temperature and inoculation) but obtained different results. Indeed, contradictory results are reported in terms of non-*Saccharomyces* persistence and fermentation completion reflecting the influence of the matrix composition on yeast interactions. However, other differences (must sterilization, yeast strain) in methodology can also explain these discrepancies.

Initial sugar concentration can impact yeast growth but also the capacity of yeasts to interact with other yeasts. The ability to take up glucose varies with glucose concentration with a species-dependent effect. Outside the 160-190 g.l⁻¹ range, non-*Saccharomyces* yeasts are less able to take up glucose and become less able to compete with *S. cerevisiae* in mixed cultures [27]. In addition, initial sugar concentration and the amount of sugar metabolized by *S. cerevisiae* could have an impact on toxic compound production and further on population dynamics in mixed cultures: a delay in *Hanseniaspora guilliermondii* (*H. guilliermondii*) death can be observed when the initial sugar concentration is 100 g.l⁻¹, compared to a standard medium with 200 g.l⁻¹ [52]. These effects are not always verified since *Lachancea thermotolerans* (*L. thermotolerans*) can survive until the end of fermentation with 200 g.l⁻¹ of initial sugars [39] but not with 160 g.l⁻¹ of initial sugars [31], although other factors can be involved (total population, oxygenation, strain). At high sugar concentrations (up to 200-300 g.l⁻¹), yeasts can delay their growth and have a lower growth rate, with a possible effect on population dynamics [53]. However, *L. thermotolerans* can be used in the mixed fermentation of

sun-dried grapes with a very high sugar content and become the dominant strain if inoculated at a high ratio [45].

Other medium components are also important to manage since *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts have different needs and do not metabolize nutrients in the same way. A key point is nitrogen source quality since ammonium and amino acids may be assimilated or not, with various rates according to the strain and culture conditions like temperature [54,55,56,57]. In addition, competition for nutrients can occur between strains and limiting nutrients concentrations can increase their interactions. For example, in sequential mixed cultures, an insufficient initial amount of assimilable nitrogen can be entirely consumed by non-*Saccharomyces* yeast before the inoculation of *S. cerevisiae*, resulting in incomplete fermentation [51]. Moreover, nitrogen availability has an impact on the ability of yeast to compete with other strains. When nitrogen is limited, indigenous *S. cerevisiae* strains are more competitive toward commercial *S. cerevisiae* and can co-dominate fermentation; they have higher nitrogen demand and can quickly remove nitrogen from the medium, which is then no longer available for commercial strains [58]. In addition, as the production of aromatic alcohols (as tyrosol, tryptophol), known as quorum sensing molecules, is linked to nitrogen metabolism, the amount of nitrogen can impact this production or the effects of these molecules [59].

All these differences in must composition (sugars, YAN) can cause variabilities in yeast interactions and complicate understanding of the mechanisms involved. Considering this must variability, some authors choose to standardize their fermentation medium by supplementing must with sugar or nitrogen sources. However, referring to Tables 1 and S1 (Annexe 1), it can be seen that the target level is not always the same, making comparisons between studies difficult. Moreover, Englezos et al. (2018) [60] observed that even with standardized sugar and YAN composition, grape variety still has a significant impact on non-*Saccharomyces* persistence during the fermentation process, hinting at the impossibility of effectively standardizing real must.

An alternative to these limits would be to use a synthetic medium with a fixed composition that can simulate natural must. Some researchers have chosen to use a quite simple medium such as a classical laboratory medium supplemented with sugars [26,28], while others have used compositions more similar to natural must, called “synthetic must” or “synthetic juice” [61]. Here, several key choices subsist, as some nutrients can impact yeast dynamics: the proportion of fructose in sugars [62,63], vitamins, and growth factors [64]. Authors have usually used this type of media to allow for effective standardization while studying the impact of a specific factor on interactions. For example, Wang et al. in 2016 [65] used synthetic must to show strain dependence in interactions between multiple *Saccharomyces* / non-*Saccharomyces* couples. Shekhawat et al. (2017) [29] also used synthetic grape juice to study the impact of must oxygenation on mixed cultures of *L. thermotolerans* / *S. cerevisiae*.

The inoculation procedure is also an important parameter. Authors have conducted mixed fermentations with the simultaneous or sequential inoculation of yeasts, with various times between both inoculations. The addition of *S. cerevisiae* after non-*Saccharomyces* can delay their death and increase their influence on wine characteristics. *L. thermotolerans* can be present until the end of fermentation, when *S. cerevisiae* is added 24, 48, or 72 h afterwards [33,39], but its population decreases drastically when a longer delay is used (4 days) [35,41]. However, some authors have observed a decrease with inoculation performed after 24 h [46], 48 h [14,31,44], or 72 h [37,66] indicating that other factors (medium composition, temperature, oxygenation) can interact. Non-*Saccharomyces* can also, in sequential culture, become the dominant strain and negatively impact *S. cerevisiae* growth, as was shown for *L. thermotolerans* [39], and *S. bacillaris* [12,47,49,60,67,68,69].

Different inoculation modes can also be coupled with different inoculation ratios between the two strains present in mixed culture, which has great importance for population dynamics. In spontaneous fermentation conditions, the yeast population of freshly extracted must is overwhelmingly constituted by non-*Saccharomyces*, with *S. cerevisiae* accounting for less than 1% of the total yeast population [70]. To simulate natural conditions, some researchers have inoculated using a large amount of non-*Saccharomyces* compared to *S. cerevisiae*, with the objective of improving non-*Saccharomyces* persistence during mixed fermentation. Usually, a ratio favoring a specific yeast has a positive impact on the latter's population dynamics; longer persistence, higher population, and dominance, as was shown for *S. bacillaris* [32], *Saccharomyces kudriavzevii* (*S. kudriavzevii*) [9], *H. guilliermondii* [52], *L. thermotolerans* [45]. However, adjusting inoculation ratios is not always enough to obtain the persistence of non-*Saccharomyces* yeasts [48,51]. The initial amount of yeasts can also have an impact since the death of non-*Saccharomyces* yeasts can be linked to the presence of the high cell density of *S. cerevisiae* (*H. guilliermondii* declines when *S. cerevisiae* reaches 10^7 CFU.ml⁻¹ [52]).

The physiological state of yeast can also have an impact on interaction. Branco et al. (2017) [71] showed that *S. cerevisiae* induces the death of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures, by different mechanisms, depending on its physiological state when mixed culture begins: cell-contact is involved when *S. cerevisiae* is in stationary phase and not when it is in mid-exponential phase. A potential explanation could be the accumulation of antimicrobial peptides on the cell-surface during *S. cerevisiae* growth, according to these authors.

Other culture parameters such as temperature can also impact population dynamics and ecosystems, since yeasts have different optimal growth temperatures [72]. *S. cerevisiae* is better adapted to higher temperature and even modifies temperature through heat production during fermentation [73]. The application of low temperature can favor the growth, survival, and even dominance of non-*cerevisiae* species [74,75,76] and of non-*Saccharomyces* yeasts [77]. Temperature can also increase the competitive

ability of non-*Saccharomyces*: *L. thermotolerans* has an inhibitory effect on *S. cerevisiae* growth at 20 °C, while at 30 °C, *S. cerevisiae* competes better and *L. thermotolerans* biomass declines after 4 days [33]. Maturano et al. (2016) [78] even showed that the temperature of cold maceration prior to alcoholic fermentation can positively impact interspecific distribution. Temperature can also impact yeast metabolism. The response of *S. cerevisiae* against the presence of another strain (coculture), by gene expression, is indeed dependent on temperature (transcriptional response higher at 12 °C than at 20 °C) [10]. The variation of fermentation temperature may be involved in the variability of the results obtained by various authors. Differences in fermentation kinetics observed with red and white must (complete at 17 and 24 days respectively) by Whitener et al. and Becker Whitener et al. can be partly explained by differences of temperature (25 and 15 °C) [36,41]. Englezos et al. also explained the different impacts on ethanol content in their works of 2016 and 2018 by temperature differences between protocols [79]. Bagheri et al. recently showed that the population dynamics in a multi-species yeast consortium were affected by temperature, influencing consequently aroma compounds production [80].

One other key point used to explain the differences observed in population dynamics is oxygen availability, induced by different conditions of oxygenation and agitation in various authors' protocols. Oxygen is indeed also known to have impacts on yeast interactions. Non-*Saccharomyces* yeasts are usually less tolerant to low oxygen availability than *S. cerevisiae* [30]: oxygen can increase their survival in mixed culture without affecting *S. cerevisiae*, resulting in a species-dependent variation in population dynamics (persistence) [29,43,67].

On the contrary, removing oxygenation and agitation altogether and allowing fermentations to occur in static conditions makes it possible to get closer to standard vinification conditions. These conditions, besides limiting oxygen intake, also allow the natural sedimentation of yeasts to occur. This sedimentation leads to heterogenous cell distribution, with an increase of local cell density in the sediment and a decrease in the supernatant. Cell density, as shown by Nissen et al. (2003) [26] is a key factor in yeast interactions. Cell density can also favor cell-cell contacts and coaggregation mechanisms which both seem to be involved in the population dynamics and metabolic changes observed in mixed cultures [24].

Studies have also shown that yeast interactions are heavily strain dependent. Perrone et al. (2013) [81] studied 99 strains of autochthonous *S. cerevisiae* in must and showed that their dominance behavior varies and is expressed only when *S. cerevisiae* senses other yeasts in the same environment. As far as interactions between non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* are concerned, mechanisms can be influenced by the strain chosen for both species. Wang et al. (2016) [65] observed that culturability loss of non-*Saccharomyces* because of interactions with *S. cerevisiae* is species- and strain-dependent. On the other hand, Englezos et al. (2016, 2019) [12,69] showed that *S. cerevisiae* strain choice also has a key impact on population dynamics (*S. bacillaris* is

more or less able to dominate various *S. cerevisiae* strains), sugar consumption, wine composition (ethanol, glycerol, acid production), wine volatile compounds (decrease or increase of aroma production depending on the *S. cerevisiae* strain).

2.2. Yeast Interactions: Understanding Population Dynamics

When yeasts are cultivated together in the same medium, as happens in natural must, different interactions occur, with visible and measurable impacts on population dynamics (dominance of one strain, decline or death of others) and cell physiology.

Researchers usually approach population monitoring quantitatively: using the methods described below, they manage to get an overview of general population dynamics. However, a more qualitative approach can supplement this, by giving more information on the physiological state of the yeast cells monitored.

Yeast populations in mixed fermentations are often quantified by traditional methods such as plating using colony morphology, media composition, selective additives, and/or differential growth optima which allow distinguishing between different species [14,60,69,82,83,84]. Yeast populations can also be discriminated by using a combination of selective and non-selective culture media [26,33,52,65,71,85,86,87]. The incubation of plates at different temperatures can also be the solution to determine the population of different strains, the main example of this being *S. cerevisiae* growing at 37 °C while non-*cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts do not [10,88,89].

These methods are well understood, efficient, and rather precise. Moreover, they allow accurate interspecies discrimination using phenotypic differences, and provide information on the cell cultivability of the populations studied. However, growth time on plates involves a delay in analysis which can prove impractical when monitoring wine fermentation in real time. In addition, these culture-dependent techniques can hardly be used to monitor complex ecosystems, since some strains overcome others in culture medium [90]. They also can overlook microorganisms that grow slowly on artificial media or are present in very small amounts [72]. Moreover, sometimes, no colonies can be observed on plates, since some yeasts are in a viable but non-culturable state (VBNC) as a result of stress induced either by interaction with other yeasts or culture conditions. To confirm this state and evaluate the capacity of yeasts to recover, they are transferred into fresh liquid nutritive medium and incubated for 24-48 h, once or twice: VBNC yeasts after these cultures in ideal conditions can be cultivated again [65,91].

The need for new or adapted analysis methods that shorten the delay in obtaining information has thus emerged. Zupan *et al.* (2013) [92] presented a quick method to monitor the number of viable yeasts during fermentations, using microscopy and image analysis software; yeasts are observed on a hemocytometer with three settings of the same microscope to count viable, non-viable and total cells.

Flow cytometry is also an interesting technique used to enumerate microbial populations by automating the counting process, and Longin *et al.* (2017) [93] showed its potentiality for monitoring yeast populations during wine fermentation. As with plating, discriminating between both species studied is essential to monitor populations and highlight yeast interactions. To differentiate various strains, modified strains expressing fluorescent proteins are often used, as in the recent study by Petitgonnet *et al.* (2019) [46], which makes use of a GFP-modified *S. cerevisiae* to show its capacity to inhibit *L. thermotolerans* by cell-cell contact linked mechanisms. In these cases, it is necessary to verify that these modified strains have the same behavior as wild strains. This allows managing the proportion of *S. cerevisiae* in a mixed culture [94,95]. Another strategy is to use fluorescence in situ hybridization (FISH), like Wang *et al.* in 2014 [96], who developed specific probes and optimized conditions to monitor *S. cerevisiae* and two non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures. This method is simple, rapid, and sensitive, but it involves membrane permeabilization and does not give information in real time or on cell viability. Flow cytometry can also be used to obtain extensive information on cell physiological state, as discussed below.

Authors have also used quantitative PCR to monitor yeast populations: from the isolated total DNA, amplifying a gene with species-specific primers gives the proportion of each species, and then extrapolates the population of each species in the total population. This method is rapid and very sensitive [90]. Andorra *et al.* (2010) [72], Wang *et al.* (2015) [70] studied the total population present in natural must by different techniques and showed that qPCR can be used to analyze the dynamics during wine fermentation; its advantage over culture-dependent techniques is that it takes into account non culturable yeasts. This qPCR technique was used recently to study the impact of competition between *S. cerevisiae* and other *Saccharomyces* yeasts on growth fitness and to understand the impact of nitrogen on competition between different strains of *S. cerevisiae* [58,76]. Garcia *et al.* (2017) [97] applied this method to monitor five non-*Saccharomyces* strains in a mixed culture, with satisfying efficiency (good specificity, sensitivity down to 10^3 cells.ml⁻¹, linearity). Another method, reverse transcription (RT)-qPCR can be used but this methodology underestimates the culturable population in wine due to the decrease of rRNA level in cells facing environmental stress (ethanol, nutrient depletion) [70]. These RNA/DNA-based methods have several advantages; they save time, they are interesting in the case of microorganisms difficult to cultivate (need for specific medium, VBNC) [70,90] and they provide precise discrimination between strains. However, these methods do not provide any information on cell physiological state or viability, since DNA from dead cells is also detected.

To study the physiological state of yeasts from mixed cultures, authors have used specific staining with different compounds and probes, allowing them to either assess viability, and even to study specific consequences on some aspects of cell physiological state. Coupled with flow cytometry (or epifluorescence microscopy), staining can

provide rapid information, but choosing suitable dyes is complex and depends on both the microorganism and medium. Longin *et al.* (2017) [93] discussed these choices extensively in their review on flow cytometry applied to wine. For example, staining with propidium iodide (PI) can be used to evaluate the viable populations in mixed culture [46], or to study the impact of interaction mechanisms such as anti-microbial peptides on membrane permeability [91,98]. Another marker, fluorescein di-acetate (FDA) or carboxy-FDA (CFDA), can be used as an indicator of cellular vitality since it reflects enzymatic activity (esterase) [93]. This fluorophore is used by Gobert *et al.* (2017) [55] in cocultures involving *S. bacillaris* and *S. cerevisiae*, to monitor yeast viability during fermentations. Double stainings are often used to help discriminate live cells and assess viability during mixed fermentations [65,93,99].

Fluorophores can also be used to measure intracellular pH (pHi) since this important parameter influences metabolism and can lead to cell membrane disruption if it is modified [93]. Probes such as 5,6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (CDCF) or 5,6-carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester (cFDA-SE) (for pH values between 3-4.5 and 4-7 respectively) combined with flow cytometry, epifluorescence microscopy or fluorescence ratio imaging microscopy (FRIM), give information on pHi [91,98], highlighting how exposure to anti-microbial peptides (AMPs) can induce a drop in pHi in non-*Saccharomyces* cells during fermentation.

Based on DNA-techniques, other methods have been developed to show a difference between live and dead cells, by using dyes able to enter cells with compromised membranes and bind to DNA, making them non amplifiable by PCR. Ethidium monoazide bromide (EMA) qPCR can then be used to monitor viable yeasts during must fermentation [70,100]. FISH can also be coupled with live/dead staining such as IP/DAPI [99], to assess the identity and viability of strains in mixed cultures at the same time.

Yeast interactions impact population dynamics and their metabolism with consequences for fermentation kinetics (more or less rapid and complete consumption of substrates (sugars, yeast assimilable nitrogen, oxygen), the production of ethanol) and for the production of other metabolites (differences in quality and content (glycerol, organic acids, aroma compounds)). Authors have usually used the same methods to monitor all these compounds: enzymatic techniques [58,65,84], or high-performance liquid chromatography HPLC [9,54,69,81,101]. Fourier transformed infrared spectroscopy FTIR can also be used since it is very convenient, simple, and rapid, but the results can lack precision. More recently, a new approach is to study more globally the metabolites produced by yeasts [46,84,102] to obtain information on the global metabolism of strains and better evaluate the role of each strain in imprinting its own metabolomic signature on the mixed culture medium.

2.3. Yeast Interactions: Understanding Mechanisms

Although most authors have studied population dynamics and metabolite production, some of them have focused on various mechanisms involved in yeast interactions. Interactions can be linked to modifications of medium during fermentation (decrease of nutrients or the production of inhibitory or toxic compounds) or to the direct action of a yeast on another one (with physical cell-contact, through molecules present on the cell surface). To understand these phenomena, authors can employ different strategies often used in parallel studying the impact of specific culture conditions on yeast populations and metabolisms (modification of medium composition, increasing cell contacts, suppressing cell contacts); highlighting the presence of cell contacts, modification of physiological state induced by interactions.

These different methods are described below. In addition, they are nowadays supplemented by more recent techniques: metabolomic, transcriptomic, and genomic techniques, on which we will focus in part 2 of this review and further.

Nissen *et al.* (2003) [26] were among the first authors to develop a strategy to understand which mechanisms are involved in yeast interactions in wine. They used modifications of culture conditions (addition of live or dead cells, addition of medium from other cultures, addition of nutrients) to highlight or not different interaction hypotheses.

In mixed culture, when certain yeast populations decline or death is observed, the first possibility is that nutrient competition occurs between both strains. To check this eventuality, authors have studied the addition of fresh culture medium or the replacement of the depleted one [26,68,84] and their impact on population dynamics.

The second hypothesis is the production of specific compounds by a strain impacting the growth of another (whether by toxic properties or other mechanisms like quorum sensing). To include or rule out this possibility, yeasts can be cultivated in pure culture in supernatants obtained from mixed culture (potentially containing toxic or inhibiting compounds (ethanol, fatty acids, peptides)), with supplementation in nitrogen sources to avoid nutrient limitation [52], or without supplementation [25,26,68]. This *modus operandi* can also be used to test the antimicrobial activity of peptides produced by yeasts in pure or mixed culture: more or less purified supernatants are incubated with different microorganisms [5,91,103]. This strategy makes use of a cell/medium separation technique by centrifugation, that can induce stress in yeasts (as shown by Chlup *et al.* 2008 [104]) and perhaps impact their metabolism.

To highlight the involvement of physical contact between two different yeast populations, biomass behaviors can be compared between a pure culture and a culture with the addition of another strain in different states and densities. Researchers have observed that the growth of non-*Saccharomyces* yeasts is not impacted by the addition

of cellular debris or dead cells of *S. cerevisiae* but is immediately stopped when viable cells are added [25,26]. Thus, they showed that the presence of viable *S. cerevisiae* is necessary to influence the growth of the second yeast. In addition, they observed that a sufficiently high cellular density is required to obtain this impact, indicating the possibility of competition for space or the implication of a cell-contact mechanism. By changing the cell concentration in pure culture fermentation or the ratio of non-*Saccharomyces* / *S. cerevisiae* in mixed cultures, Nissen and Arneborg (2003) [25] showed that early death is not solely a consequence of high cell density or a low ratio but also of different abilities to compete for space.

Therefore, to prove that physical contact is necessary to observe a modification of population dynamics, one strategy is to suppress these contacts artificially by separating both yeast populations by a semipermeable membrane that prevents contacts between the yeasts but allows the exchange of substrates and metabolites between the two compartments. If cell-cell contacts are involved in yeasts interactions, yeast behaviors will be different in these conditions from those in mixed fermentations. Some authors used simple systems (tube or flask with dialysis membrane) with different conditions: without agitation and with a cut-off of 12-14 kDa [9,25,26,46], with agitation and a cut-off of 3.5-5 kDa [28] or 1000 kDa [28,71]. To ensure homogeneity on both sides, some authors measured the concentrations of only a few substrates and metabolites (ethanol for Nissen *et al.* 2003 [26], glucose and ethanol for Kemsawasd *et al.* 2015 [28]). Nissen and Arneborg (2003) [25] specified that fouling of the membrane was observed after 4 days of fermentation, with a difference in composition (glucose, ethanol) in both compartments. Kemsawasd *et al.* (2015) [28] noticed that peptides and proteins were freely transported through a 1000 kDa membrane but that 3.5-5 kDa was slightly permeable to molecules larger than 5 kDa, so that AMPs could be present in both compartments (AMPs derived from GADPH are about 8 kDa according to Branco *et al.* 2014 [101], AMPs studied by Albergaria *et al.* 2013 [103] are 2-10 kDa). More recently, Petitgonnet *et al.* (2019) have evaluated metabolism changes more globally by using metabolomic techniques and highlighted a notable difference in exo-metabolomes between fermentations with and without physical contact [46]. This aspect will be further developed at a later stage.

To study competition between different strains of *S. cerevisiae*, Perrone *et al.* (2013) [81] chose to use a partitioned reactor that had already been used in studies of bacteria cocultures (Di Cagno *et al.* 2009) [105]; a double culture vessel apparatus with compartments separated by a 0.45 μm membrane, and which can be stirred. The membrane allows the transfer of medium compounds and composition homogeneity is verified by HPLC for sugars, alcohol, glycerol, acids; only one difference was observed for sugars but with a value close to instrumental reproducibility. Lopez *et al.* (2014) [106] and Taillandier *et al.* (2014) [51] used a reactor composed of two jars interconnected with a hollow fiber membrane (0.1 μm). They regulated the flow between both compartments using alternating pressurization, but they observed

fouling after 21 h of culture. The system proposed by Renault et al. (2013) [107] seemed to be more efficient. They designed a new double-compartment reactor; separation was ensured by a 1 μm membrane, a pump circulated the medium between both compartments through a 0.45 μm filter to homogenize it without the transfer of yeasts; it was also equipped with automatic reversal of the pumping direction to avoid clogging. All these systems used different means to separate yeasts while ensuring metabolic homogeneity, but they did not seem to allow the immediate transfer of all the metabolites in both compartments. That is why other authors took a completely different approach to investigate the involvement of cell contact in yeast interactions. Rossouw et al. (2018) [108] used a genetic system (based on FLO gene family) to modify cell adhesion properties and show that interspecies contacts impact population dynamics as the mechanism was called cell-cell contact by other authors. They made use of a simple sedimentation rate measurement to assess interspecific coaggregation. This macroscopic approach to aggregation dynamics could then be supplemented by microscopic analysis.

Various microscopy techniques can also be used to study different types of contact between yeasts; cell-cell contact, aggregation, or coaggregation with other cells or solids. Fluorescence microscopy with cell staining was used by Rossouw et al. (2015) [109] to highlight the co-flocculation of *S. cerevisiae* and *Hanseniaspora opuntiae* (*H. opuntiae*) in mixed cultures and to study the involvement of different FLO genes on flocculation. Cell staining can also be used with flow cytometry, as shown in Pérez-Torrado et al. (2017) [94], which makes use of sonication to highlight cell aggregation. Caldeira et al. (2019) [110] observed the surface of yeast in mixed cultures by atomic force microscopy and showed the existence of direct cell-cell contact. Scanning electron microscopy (SEM) can be used to highlight the aggregation of yeasts in wine with the same or other yeast species, or with solids (as shown by Govender et al. 2011 [111]).

Epifluorescence microscopy observations can also be used to study how anti-microbial peptides (AMPs) act on yeast. Branco et al. (2017) [86] used chemically synthesized AMPs, with fluorescent labelling, and added them to the medium culture of non-*Saccharomyces* yeasts. They noticed that these AMPs can enter cells and at the same time, cells that internalized these AMPs showed compromised cell membranes (PI-stained).

Other less conventional methods can also be used to study the interaction mechanisms. For example, Branco et al. (2017) [71] used immunologic testing to highlight the involvement of cell contact in AMP activity. After extracting and fractionating surface proteins from *S. cerevisiae*, they analyzed fractions by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) using a specific antibody against GAPDH-derived AMPs. They showed that these AMPs accumulated on cell surfaces, suggesting a potential link between cell-cell contact mechanisms and these AMPs.

In addition to all the analysis techniques discussed previously, novel omics approaches are nowadays widely used to solve different problems and are used to describe an organism's response to genetic or environmental changes. The impact of cell interactions on yeast metabolism is no exception, and proteomics and transcriptomics in case of yeast–yeast interactions in wine have been used extensively in recent years. Most of the studies performed to characterize the consequences of co-cultures and interactions between microorganisms on gene expression and protein synthesis have focused on comparisons with *S. cerevisiae*, an organism that has undergone extensive investigation [88,112,113]. The modulation of gene expression has been clearly observed during alcoholic fermentation [9,112,113]. Most of the genes whose expression is modified during co-cultures and interactions are involved in stress response, endocytosis, membrane biogenesis, nutrient uptake, and apoptosis [84,88,89]. Complete metabolic pathways are affected by altered gene expression, as shown by Sadoudi et al. [87], with a change in acetic acid and glycerol metabolism in *S. cerevisiae* in the presence of *Metschnikowia pulcherrima* (*M. pulcherrima*). More specifically, in the case of direct cell contact between two populations of distinct species, a change in the expression of FLO genes has been described, leading to a modification of population dynamics [109]. We will not develop this aspect in our discussion, as the subject has recently been discussed and detailed by Conacher et al. [24].

3. Environmental Changes Related to Interactions and Sensory Impacts

Proteomics and transcriptomics provide insights into the impact of interactions on wine composition [24,89,112,114] but none of them has so far provided significant progress on the microbial interaction mechanisms involved. Metabolomics is a tool of choice for observing the impact of yeast interactions on the composition of the wine matrix and more interestingly, it can help unravel the as yet unknown mechanisms involved in these interactions. Analytical techniques developed for metabolomics studies allow screening hundreds of metabolites from various metabolic pathways with high-throughput techniques [115] that link the impact of yeast interactions to wine composition [102].

The literature includes various studies in which the specific composition of wine enables distinguishing between wines on the basis of fermentations with different yeast species and strain [116,117,118,119] and with single and co-cultures [46,102,120,121].

3.1. Metabolic Profiling

Non-targeted metabolomics studies provide a global vision of the modifications of the matrix. Through this approach, all the products from metabolic pathways affected by interactions with a second microbial population can be studied. Only a few studies aimed at understanding yeast–yeast interactions in wines have been carried out using this non-targeted metabolomic approach. Some studies have used FT-ICR-MS to

explore metabolomes in wine [46,102,122]. In 2016, Liu et al. [122] studied fifteen strains of *S. cerevisiae* known to positively or negatively impact malolactic fermentation (MLF) through interaction with lactic acid bacteria. They identified a wide variety of markers such as oligopeptide and sulfur-containing peptide metabolites for each of the yeast phenotypes studied. Later, Petitgonnet et al. [46] highlighted changes in the exo-metabolome of wines from co-culture fermentation, depending on the presence or not of a physical barrier. The originality of this paper resided in the study of the physical separation of the two populations. Indeed, greater diversity of compounds was demonstrated in *L. thermotolerans* alone and contactless *S. cerevisiae*/*L. thermotolerans* modalities. Biomarkers specific to these modalities were mainly identified as involved in amino acid metabolism and carbon fixation. The general conclusion of the study shows that cell to cell yeast interaction does induce a significant change of diversity and variability in the intensity of metabolic compounds in final wine composition [46]. More recently, Roullier-Gall et al. [102] worked on the non-volatile metabolic fingerprint comparison of three different non-*Saccharomyces* species in single and co-cultures with *S. cerevisiae*. It was pointed out that the metabolite composition of wine from the co-culture did not match the assembly of two wines resulting from single yeast fermentation, an observation already made in previous studies [120,123] involving non-neutral interaction phenomena.

The majority of non-targeted works have focused on the metabolome at the end of alcoholic fermentation and therefore are not able to reveal at what stage of growth and fermentation metabolic changes occur. Fortunately, several papers have focused on the different stages of fermentation, including works from Richter's team in 2015, who conducted alcoholic fermentation on Chardonnay must with *S. cerevisiae* [124]. Significant metabolic changes were identified at each stage of the fermentation studied. This contribution made it possible to attribute a certain regulation of yeast metabolism during fermentation to the efficiency of the glycolytic pathway, probably due to a reduced activity of several enzymes or to glucose transport. In 2018, Peng et al. [121] demonstrated the impact of bringing together two yeast populations of *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* at two key points of alcoholic fermentation: at the onset of early death of non-*Saccharomyces* yeast and at the end of this phase. Owing to NMR, a single culture of *L. thermotolerans* and a co-culture were discriminated based on metabolite composition variations. On the contrary, no changes could be identified when comparing the metabolome of the single culture of *S. cerevisiae* and co-culture. In addition, they highlighted that part of the metabolite composition disappeared at the end of fermentation, suggesting that metabolic changes of co-culture occur after the death of the non-*Saccharomyces* yeasts [121]. It also appears that at different sampling times, the diversity and concentration of metabolites is very different compared to previous works on single culture [124,125]. These works highlighted that sampling time is an essential point for understanding interaction phenomena. Furthermore, studies [124,126] began to explore the differences between the endometabolome and the exometabolome associated with microorganisms involved in fermentation processes

to explain the mechanisms involved in interactions. However, it remains difficult to study the endometabolome because of the complexity of sampling [127]. Therefore, recent works have focused on modelling the composition of the endometabolome based on exometabolome measurements [126].

It should also be noted that the identification of compounds detected during the metabolic profiling of the non-volatile fraction of wine remains difficult at present. The complexity of wine has been widely described and still presents many shadowy areas. The databases giving the molecular compounds present in wine remain poorly supplied and do not allow identifying all the biomarkers [102,128,129].

Targeted analysis, often associated with hypothesis verification, involved detecting and quantifying known metabolites in the wine [130,131,132]. Targeted metabolomics is particularly used for studying the impact of microorganisms [118,133] and interactions [134,135] during winemaking. In the context of leavening different starters to carry out fermentations in the best possible way and with the objective of managing the final quality of Syrah wines, Minnaar et al. [134] were interested in understanding the microbial interactions involved. It would appear that microbial interactions affect the production of polyphenolic compounds including anthocyanins, flavonols, and phenolic acids. Different combinations of starters were studied, involving respectively a strain of *S. cerevisiae* with *M. pulcherrima* or *Hanseniaspora uvarum* (*H. uvarum*), *S. cerevisiae* and one of the non-*Saccharomyces* with a LAB strain, and *S. cerevisiae* with a lactic acid bacteria (LAB) with a single starter of *S. cerevisiae*. They identified for the mixed starter of *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* a decrease in the amount of gallic acid and of caffeic acid for *H. uvarum*/*S. cerevisiae*. Similarly, Nardi et al. [135] studied the impact of a co-culture of *S. cerevisiae* with a strain of *T. delbrueckii* in combination or not with a strain of *O. oeni*. They were able to demonstrate that among the extracted compounds, involved in the discrimination of the different conditions, there was an increase in certain metabolites such as amino acids like alanine and threonine, and at the same time a decrease in deleterious compounds such as acetic acid. These works described the consequences of the presence of several yeast populations in co-cultures but did not describe the mechanisms involved in the underlying interactions.

3.2. Volatilome

The yeast metabolome does not consist entirely of compounds from the non-volatile fraction. In fact, a wide variety of volatile organic compounds (VOCs) are released during the winemaking process and enrich the total wine composition. These compounds produced by microorganisms are grouped together under the term “volatilome” [136]. The composition of the volatilome is related to the species [47,137] and the strains of microorganisms [79,138] used to conduct alcoholic fermentation. In addition, the interactions occurring in consortia or co-cultures also influence the VOC composition of wines [139]. Many VOCs participate in the aromatic profile of wines, as developed later in the discussion [140,141,142]. Unfortunately, as with non-volatile

omics studies, most volatile studies focus on the impact of yeast interaction on the final VOC composition of co-cultured wines, but few explain the mechanisms of interactions and allow us only to hypothesize about the nature of yeast interactions.

VOCs can be produced by yeasts metabolizing sugars and amino acids and belong to different families of compounds including esters, higher alcohols, medium fatty acids, or aldehydes. Among these fermentation aromas, esters are widely represented, comprising acetate esters and ethyl esters. In the case of co-cultures between *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts, the concentration of the major esters is mainly increased. For mixed crops in which *M. pulcherrima*. [47,143] and *H. uvarum* [144] are involved with *S. cerevisiae*, the concentration of esters increases, for example that of phenylethyl acetate. For the most part, mixed crops, including *S. bacillaris*, present higher concentrations of total esters [79,138], including ethyl octanoate or isoamyl acetate [14] compared to pure *S. cerevisiae* fermentation conditions. Conversely, when focusing on Muscat wort, Gobert et al. [55] showed a decrease in the production of isoamyl acetate in sequential fermentations of *S. bacillaris* and *S. cerevisiae*. Similarly, some esters such as isoamyl acetate and ethyl octanoate are detected in higher concentration in wines from co-fermented wort with *S. cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* (*T. delbrueckii*) [145] or *L. thermotolerans* [45] and in lower concentrations in other studies [39,146] (Table 2). This different impact of co-culture on esters concentration can be explained by the use of various yeast strains and matrix [147]. In the same way, co-culture may increase the content of higher alcohols found in wines. This has been thoroughly described by Sadoudi et al. [47] for the mixed fermentations conducted with *Candida zemplinina* (*C. zemplinina*) and *S. cerevisiae*, Escribano-Viana et al. [37] for *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* and Englezos et al. [79,138] for *S. bacillaris* and *S. cerevisiae*. However, others studies focusing on mixed-cultures with *S. bacillaris* and *S. cerevisiae* have shown a lower concentration of certain alcohols such as 2-phenylethanol and methyl butanol [55,148]. Fatty acids have been found in lower concentrations in most of the co-cultures studied using non-*Saccharomyces* [79,135] except for the couple with *S. bacillaris* [14] and *C. zemplinina* [36] (Table 2). Varietal aromas can also be released by yeasts through the action of cleavage enzymes on odorless precursors present in the must such as terpenes, sulfur compounds, and volatile phenols [139,149]. The combination of yeast populations with a diversity of metabolism as enzymatic activity during fermentation can impact on their diversity and concentration [150]. Finally, one of the impacts studied most on VOC families in co-cultures are terpenes. The terpenes found in wines are mostly linalool, geraniol, and citronellol. In most cases they are found in higher concentrations in wines from mixed culture alcoholic fermentation [36,147].

Table 2. Impact on volatile organic compounds of different mixed starters.

Mixed Culture	VOCs Families	VOCs Impacted by Interactions	Impact	Inoculation Protocol	Mixed Culture Compared to	Matrix	SA	Ref.
<i>S. cerevisiae</i> / <i>S. cerevisiae</i>	esters	acetate esters	-					
		ethyl dodecanoate	+	sim/blend	S	Sauvignon blanc	x	[123]
	thiols	3-mercaptohexan-1-ol	+					
<i>C. zemplinina</i> / <i>S. cerevisiae</i>	thiols	3-mercaptohexan-1-ol	+	sim	S	Sauvignon		[151][47]
			-	seq	S and NS	Sauvignon		[47]
	higher alcohols		+	seq	S and NS	Sauvignon		[47]
	terpenes, lactones, norisoprenoids		-	seq	S and NS	Sauvignon		[47]
	lactones		+	seq	S	Shiraz		[36]
	ethyl esters, MCFA		+	seq	S	Shiraz		[36]
<i>L. thermotolerans</i> / <i>S. cerevisiae</i>	higher alcohols		+	sim	S and NS	Pedro Ximenez		[45]
				seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]
		1-propanol, methionol		seq	S	Tempranillo		[37]
		2-methyl butanol, 3-methyl butanol, iso-butanol		sim/seq	S	Emir	x	[39]
			-	seq	S and NS	Muscat		[46]
<i>L. thermotolerans</i> / <i>S. cerevisiae</i>	esters	2-phenyl ethanol acetate, ethyl acetate, isoamyl acetate, isoamyl decanoate	+	sim	S and NS	Pedro Ximenez		[45]
		ethyl octanoate		seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]
		2-phenylethyl acetate, isobutyl acetate, hexyl acetate		sim/seq		moschofilero	x	[147]
				seq	S	Shiraz		[36]
				sim/seq	S	Ecolly, Cabernet Sauvignon	x	[144]
		isoamyl acetate	-	sim/seq	S	Emir	x	[39]
				seq	S	Synthetic must with precursors		[152]
				seq	S and NS	Muscat		[46]
	fatty acids		+	seq	S and NS	Muscat		[46]

			-	seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]
	ethanoic acid			sim	S	synthetic must		[153]
	terpenes	geraniol, citronellol	+	sim	S and NS	Pedro Ximenez		[45]
				seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]
		geraniol, damascenone		sim/seq		moschofilero	x	[147]
		geraniol, linalool, α terpinene		seq	S	Shiraz		[36]
		linalool, geraniol		seq	S	Synthetic must with precursors		[152]
	aldehydes/lactones		-	sim	S and NS	Pedro Ximenez		[45]
	volatile phenols/norisoprenoïds		+	sim	S and NS	Pedro Ximenez		[45]
<i>H. uvarum</i> / <i>S. cerevisiae</i>	higher alcohols		-	seq	S and NS	Rondo, Bolero, Regent	x	[122]
				seq	S	Malbec		[154]
	esters		+	sim/seq	S	Ecolly, Cabernet Sauvignon	x	[144]
		ethyl acetate, 2-phenylethyl acetate		seq	S and NS	Rondo, Bolero, Regent	x	[122]
	fatty acids		-	seq	S	Malbec		[154]
<i>T. delbrueckii</i> / <i>S. cerevisiae</i>	higher alcohols	2-phenyl ethanol, methionol	+	seq	S	Chardonnay, Soave, Vino Santo	x	[146]
		2-phenyl ethanol, 1-butanol, methionol		seq	S	Tempranillo		[37]
		2-phenyl ethanol		seq	S	Sauvignon		[47]
				seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]
		phenylethyl alcohol		sim/seq	Sc	Cabernet sauvignon		[155]
	esters	acetate esters (2-phénylethyl acetate, isoamyl acetate, hexyl acetate, isobutyl acetate) and ethylesters (ethyl lactate, ethyl octanoate, ethyl hexanoate))	+	seq	S	Sauvignon, Syrah	x	[145]
				sim/seq	S	Cabernet sauvignon		[155]
		acetate esters		sim	S	Barbera	x	[135]
		acetate esters (isoamyl acetate) and ethylesters (ethyl octanoate)	-	seq	S	Chardonnay, Soave, Vino Santo	x	[146]
		acetate esters		seq	S	Sauvignon		[47]
fatty acids	hexanoic acid and octanoic acid	-	seq	S	Chardonnay, Soave, Vino Santo	x	[146]	
			seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]	

			sim/seq	S	Cabernet sauvignon		[155]
			sim	S	Barbera	x	[135]
terpenes	geraniol, linalool, α terpinene	+	seq	S	Shiraz		[36]
	linalool, geraniol		seq	S	Synthetic must with precursors		[152]
	geraniol, nerolidol, farnesol		seq	S	Sauvignon		[47]
			seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]
			sim/seq	S	Cabernet sauvignon		[155]
volatile phenols	4-vinylphenol, 4-vinylguaiaicol	-	seq	S	Chardonnay, Soave, Vino Santo	x	[146]
			sim/seq	S	Cabernet sauvignon		[155]
higher alcohols		+	seq	S	Chardonnay, Riesling, Muscat, Sauvignon blanc		[79]
			seq	S	Barbera		[138]
			seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]
	2-phenylethanol	-	sim	S and NS	Montepulciano	x	[148]
			sim/seq	S	Kotsifali / Mandilari		[49]
	isobutyl alcohol 1-hexanol increase, methyl butanol decrease	+/-	seq	S	Muscat		[55]
esters		+	sim/seq	S	Kotsifali / Mandilari	x	[49]
			sim	S and NS	Montepulciano	x	[148]
			seq	S	Chardonnay, Riesling, Muscat, Sauvignon blanc		[79]
			seq	S	Barbera		[138]
	ethyl octanoate, isoamyl acetate		seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]
	isobutyl acetate phenylethyl acetate, isoamyl acetate	+/-	seq	S	Muscat		[55]
fatty acids		+	seq	S	Chardonnay, Riesling, Muscat, Sauvignon blanc		[79]
volatile phenols, carbonyl compounds		+	seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]
		-	seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]
higher alcohols	1-propanol, methionol	+	seq	S	Tempranillo		[37]

S. bacillaris / S. cerevisiae

			sim	S	Merlot	x	[156]	
			seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]	
	phenylethyl alcohol, isobutyl alcohol		seq	S	Muscat		[55]	
		-	sim	NS	synthetic must		[153]	
M. pulcherrima/ S. cerevisiae	esters	+	sim	S	Merlot	x	[156]	
			seq	S	Shiraz		[36]	
			seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]	
			seq	S	Muscat		[55]	
			seq	S	Sauvignon		[47]	
	fatty acids	+	seq	S	Sauvignon		[47]	
	terpenes	+	seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]	
		geraniol, linalool, α terpinene		seq	S	Shiraz		[36]
		linalool		seq	S	Sauvignon		[47]
	volatile phenols, carbonyl compounds	-	seq	S and NS	Pinot Grigio	x	[14]	
sulfur compounds	dimethylsulfide, ethanethiol, sulfure hydroxyde	+	sim	S	Merlot	x	[157]	
Mix of four non-Sacch and three S. cerevisiae	total acids	-	seq	S and NS	synthetic must	x	[157]	
	others compounds	=						
S. cerevisiae / non-Sacch and T.d	methionol, ethyl lactate	-	seq	S	Tempranillo		[37]	
Mix of five non-Sacch/ S. cerevisiae			seq		synthetic must Sauvignon blanc	x	[64]	

Ref. : References; *S. cerevisiae* : *Saccharomyces cerevisiae*; *C. zemplinina* : *Candida zemplinina*; *L. thermotolerans* : *Lachancea thermotolerans*; *H. uvarum* : *Hanseniaspora uvarum*; *T. delbrueckii* : *Torulopsis delbrueckii*; *S. bacillaris* : *Starmerella bacillaris*; *M. pulcherrima* : *Metschnikowia pulcherrima*; Impact on VOCs concentration : - : decrease; + : increase; +/- : two cases are encountered; = : no change; sim : simultaneous / seq : sequential; S : *S. cerevisiae* / NS : non-*Saccharomyces*; SA : sensory analysis; VOCs : volatile organic compounds.

Although most studies describe the impact of interactions on VOC composition in fermentation in co-culture, some papers have tried to explain the interaction mechanisms associated with these compositional changes. Sadoudi et al. [47] highlighted interaction mechanisms for three couples of yeast by comparing VOC concentration in simple cultures and mixed cultures. The concentration of some terpenols such as β -damascenone doubled in the co-culture of *M. pulcherrima* /*S. cerevisiae* showed a positive interaction between both strains. The synergetic effects of *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* have also been revealed in co-culture, exhibiting an increase in the content of terpenols, C6 compounds and 2-phenylethanol, suggesting a cumulative effect of both yeast metabolisms related to biomass. Negative interactions for *C. zemplinina*/*S. cerevisiae* were highlighted by showing a decrease in the production of farnesol in co-culture, in comparison to a pure culture of *C. zemplinina*, which could be used as a modulator of gene expression. As mentioned above, later, in 2017, the same team showed that the presence of *M. pulcherrima* induced a change in the gene expressions involved in the metabolism of acetic acid of *S. cerevisiae* in co-cultures [87]. Later, Petitgonnet et al. [46] showed the importance of cell-cell contact in VOC composition in the case of *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* co-culture. The study compared VOCs from wines in pure culture, conventional contact co-culture, and co-culture physically separated by dialysis rod. It was pointed out that ester and fatty acid concentrations were higher in co-culture without cell contact. Similarly, other studies [12,55] have focused on nutrient sources as well as on competition for nutrients between species in the case of co-fermentation together with their impact on VOC composition. In sequential fermentations nutrient sources, such as nitrogen, are reduced at the time of *S. cerevisiae* inoculation. Gobert et al. [55] highlighted that, in the case of sequential fermentation, amino acids such as leucine are consumed by *S. bacillaris* before *S. cerevisiae* inoculation. However, leucine is the precursor of VOCs including isoamyl acetate and 2-methylbutanol mainly synthesized by *S. cerevisiae*. The depletion of leucine before *S. cerevisiae* inoculation would therefore lead to under-expression of these VOCs in wines. On the other hand, this paper showed a possible synergetic effect between *S. bacillaris* and *S. cerevisiae* for the synthesis of isobutyl alcohol [55].

Although most of the work has focused on the interaction between *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts, few papers have explored other types of mixed fermentations. King and Capece studied the impact of co-cultures of different strains of *S. cerevisiae* on the volatilome [123,158]. In 2008, King found a positive variation in the thiol 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) composition of Sauvignon Blanc wines in some of the co-cultures of *S. cerevisiae* strains studied [123]. Later, Escribano et al. [137] studied the co-culture of three yeasts in sequential fermentations including two non-*Saccharomyces*, *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans* yeasts with *S. cerevisiae* yeast. Similarly, consortia including several non-*Saccharomyces* species have been considered [64,157]. Interestingly Padilla et al. [157] showed that a consortia of four non-*Saccharomyces* strains in mixed culture with three *S. cerevisiae* strains led to a decrease

in total acids and did not affect the synthesis of other compounds in comparison to a pure fermentation with commercial *S. cerevisiae*. Thus the yeast species [47] and the yeast strain [79,138] are the determining factors for the final wine VOC composition [159]. Nevertheless, the production of most of these VOCs also depends on different biotic and abiotic factors. It has been widely described that the composition of the matrix, and more particularly nitrogen sources [59], and the presence of VOC precursors have an impact on the production of VOCs [152]. In addition, the great variability in yeast inoculation protocols such as simultaneous and sequential fermentation [147], the time of adding *S. cerevisiae* in the case of sequential inoculation [39], population ratios [45,153], and environmental conditions [160] appears to play an essential role in yeast growing characteristics and subsequent VOC composition. Furthermore, the formation of these compounds occurs throughout the fermentation process. That is why some studies have aimed at identifying differences in VOC content based on the fermentation time [145]. They showed that the concentration of total esters increased by 40% from the beginning to the end of alcoholic fermentation. Another example was described by Escribano *et al.* [137] with the variation of the concentration of ethyl lactate for the ester formation due to an increase of higher alcohols in the medium. All of these factors induce additional variability between the different studies and observations [122,144].

Taken as a whole, the results of the various studies of volatile compounds show divergences. The approaches to data analysis are highly diverse, thus adding to the factors described previously that influence VOC composition. Most studies have attempted to describe differences between co-cultures and single fermentations of *S. cerevisiae* but some studies have compared the impact of these co-cultures with non-*Saccharomyces* single cultures, which may lead to differences in interpretation. Studies of VOCs in co-cultures have mainly focused on providing a descriptive approach and only a few of them have tried to explain the mechanisms leading to differences in VOC composition.

3.3. Sensory Impact

For many years, the impact of micro-organisms on the sensory component of wine has been addressed by many researchers and professionals in the wine sector. These studies have aimed at characterizing the individual impact of a *S. cerevisiae* or a non-*Saccharomyces* yeast strain on the aromatic [149,161,162,163], visual [164] and taste [165] profiles of wines. This approach is also increasingly applied to pairs or consortia of microorganisms involved in alcoholic fermentation [64,157]. In most cases the discrimination of wines fermented by more than one species of microorganism from those fermented by a single species is described. For example, Gobbi *et al.* [33] attributed more spicy and acidic notes to the co-culture in commercial white grape must compared to the single culture of *S. cerevisiae*. Barbera wine was studied after alcoholic fermentation assessed by *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* and showed a lower intensity in attributes such as floral and red fruit aromas, as well as a change in color,

becoming more intense compared to *S. cerevisiae* in pure culture [135]. The same year, Varela et al. (2017) [156] showed that wines inoculated with *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* were closer to uninoculated wines and associated with high scores for positive attributes such as red fruit aroma and overall fruit aroma, which are found in a minority in wines from *S. cerevisiae* in pure culture.

More specifically, in various studies it appears that the sequential fermentation path has a greater impact on the sensory profiles of wines than simultaneous inoculation [33,145,148]). Benito et al. [40] showed in a comparison between sequential fermentation and simultaneous inoculation, *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans*, that general acidity and overall impression were increased and described as characteristic of sequential fermentations. In 2015, the same research team also attempted to determine the impact of mixed starter wines with a non-*Saccharomyces* strain on the quality of Riesling wines [38]. As observed previously, the general impression was described as better in the case of sequential fermentations with respect to a single culture control of *S. cerevisiae*. The *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* pair was discriminated by the terms citrus/grapefruit and pear while *L. thermotolerans* / *S. cerevisiae* pair was associated with peach/apricot [38]. This last example shows that different aromatic notes are detected from the same matrix couples involving the same strain of *S. cerevisiae*, but with different non-*Saccharomyces* strains. Binati et al. [14] were also able to discriminate wines of Pinot Grigio from different sequential fermentations involving *M. pulcherrima* and *S. bacillaris* by different VOCs such as higher alcohols and esters. King et al. [123] highlighted a difference in sensory profiles between two co-inoculations of *S. cerevisiae* involving different strains characterized by box hedge and floral aromas and with different blends of two simple cultures of the same strain themselves described by the terms white vinegar and bruised apple. There is therefore an impact of co-cultivation and therefore interactions between populations on the sensory profile in addition to the strain effect. On the contrary, when studying two strains of *T. delbrueckii* in mixed culture with *S. cerevisiae*, Azzolini et al. [146] found no differences in the sensory profile with either pair. However, complexity and persistence were found to be increased in mixed cultures compared to the single culture of *S. cerevisiae*. Likewise, Liu et al. [122] mentioned that the impact of cultivar type was greater than the strain effect. Indeed, as pointed out earlier, the matrix plays an important role in the sensory profile. Hu et al. [144] confirmed the greater role of the matrix specifically the grape varieties with the observed decrease in the vegetal component in a Cabernet Sauvignon wine as opposed to an Ecolly wine fermented with the same mixed starter.

These latest works were carried out by studying VOC composition and the sensory aspect of wines in parallel; however, few of them focused on linking these two aspects. Hu et al. [144] established that the compounds that mainly contributed to tropical fruit and floral aspects of sequential fermentation that involved *H. uvarum* / *S. cerevisiae*, were C13 norisoprenoids, terpenes, and acetate esters, while the temperate fruit notes

were generated mostly by ethyl esters. Similarly, Nisiotou et al. [49] identified an association between a higher concentration of ethyl ester and the fruity aroma of wine, as previously discussed by Lytra et al. [142] for simultaneous and sequential cultivation using *L. thermotolerans*. They likewise noted a correlation between acetate esters and the floral aroma descriptor. In the work by Renault et al. [145] on the sequential fermentation of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*, the over-expression of four esters (ethyl propanoate, ethyl isobutanoate, ethyl dihydrocinnamate, and isobutyl acetate), described as minor, was highlighted. Moreover, the wine was characterized and differentiated from other modalities by fruity aromas and greater complexity. Then, they added at equal concentration the sequential condition and the single culture of *S. cerevisiae* to validate the impact of these esters on the wine sensory profile. This made it possible to highlight the sensory impact of these esters and attribute them the role of aromatic biomarker. However, it should be noted that only one of its esters was present at a concentration above its detection limit in wine. Therefore, it is suggested that the other esters also lead to aromatic modulation through different interaction phenomena. Among the four esters, ethyl propanoate and isobutyl acetate were described by several studies as enhancers of fruity notes [140,142,166].

The sensory aspect of the various studies mentioned above shows changes in the sensory profile, but they do not address or make it possible to understand or explain the mechanisms of interaction between the populations involved in alcoholic fermentation. Most authors have focused more on showing a change in the sensory profile of the wines in the case of co-culture. Indeed, sensory contribution remains complicated to integrate into a process of understanding the mechanisms of interaction, since no VOC or family of VOCs can explain the aromatic profile of a wine. It is still unclear what contribution they make to the aromatic notes. Despite trends and correlations, there is not always a mirror effect between chemical composition and sensory profiles due to the existence, among other things, of interactions between these volatile aromatic compounds and non-odorous volatile compounds to form aromas [141,167,168]. These interactions between VOCs were confirmed in a very recent publication by Mc Kay et al. [169]. Associated with these interactions, various factors can induce a mismatch between the volatile composition and the sensory profile of wines, such as the detection threshold [159,163,169,170], or the masking of certain flavors associated with volatile compounds by others, as suggested by Benito et al. [38] cited above. Higher alcohols have already been described as being able to mask these fruity notes [171]. Finally, in view of the diversity of volatile aromatic compounds, many of them participate in the same aromatic note [172]. Sensory evaluation also provides different information depending on the approach selected (description, comparison, preference, or determination of product quality), [160] and the panel of selected juries (expert or naive) [173]. Sensory analysis therefore remains an essential tool to qualify the impact of co-cultures on the final product, but it does not provide information on the interaction mechanisms that may occur.

4. Conclusion and Perspectives

This review presented the state-of-the-art of yeast-yeast interactions in wine and highlighted the difficulties of studying the mechanisms involved in these phenomena. The impact of co-culture on the final matrix is now well-known but little is understood about how this happens. Indeed, it appears that all the works presented distinct methodologies, mainly in terms of biological material with the use of different yeast species and strains, leading to a plethora of results specific to each pair. Therefore, understanding these mechanisms requires further studies at this level by combining the observation of a target mechanism with the use of different strains belonging to the same species in order to draw solid conclusions. Different matrices and the application of abiotic factors also remain a major source of diversity in the results. All these variations make it difficult to generate complementary and comparable results capable of leading to conclusions that unravel the mechanisms involved in these interactions.

During our research it became apparent that quorum sensing in yeast remains unexplained and unproven, making this gap in knowledge an important path of investigation, as discussed by Winters *et al.* 2019 [174]. Quorum sensing interactions have been proposed many times as a hypothesis by the authors [26,175], but neither have confirmed it. Although the direct impact of certain specific QS molecules on non-*Saccharomyces* growth has already been studied [59] when in high concentrations, experiments under conditions closer to those of winemaking have yet to be conducted. It also appears that the study of different types of interaction mechanisms such as cell-cell contact, for example, presents many contradictory results because of the use of different systems aimed at separating the different populations involved. The use of a double compartment bioreactor with a membrane making it possible to homogenize the surrounding medium in both compartments, while not denaturing the separation of microorganisms, seems to be a good strategy for understanding mechanisms. In addition, strategies at the molecular level can be considered to elucidate these mechanisms. For example, the creation of mutants of target genes that are presumed to be involved in mechanisms due to interactions such as cell-cell contact, and parietal genes, could be one avenue of investigation. Competition for nutrients is still difficult to assess when discriminating between the consumption of a nutrient by one or another of the populations involved. Monitoring this catabolic activity could be carried out, for example, by tagging amino acids for nitrogen competition. It was observed that, overall, the majority of the studies were essentially descriptive and failed to capture the interactions and their mechanisms. Technological deadlocks remain that must be overcome. The metabolomic approach is a real tool of choice and evokes metabolic pathways associated with changes in the composition of the metabolome, however, this requires further development of databases related to yeast metabolism in wine. With respect to representing the end result of all the metabolic and regulatory interactions that lead to metabolic changes, monitoring metabolic flows, currently called

“fluxomics,” is one of the avenues to be considered with, for example, isotopic labelling of metabolites. In addition, a question arises as to the representativeness of targeted approaches that allow the quantification of target compounds in relation to the totality of the metabolites produced. A non-targeted approach, as suggested by Suklje et al. [176], may further explain the metabolic changes that occur. Transcriptomics, an indispensable approach for understanding gene expression under established environmental conditions, is still limited from the non-*Saccharomyces* perspective, as the genomes are poorly sequenced. Data mining is also of great importance since it can lead to the establishment of models of microbial behavior in response to different individual or combined parameters. An integrated approach combining different omics techniques is a strategy of choice that was recently described by Lawson et al. [177] with the objective of better understanding the mechanisms that direct interactions within a consortium of microorganisms. However, it should be taken into account that these approaches provide additional information and do not always lead to a general combined conclusion.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table 1S: (Annexe 1) Diversity of methodologies and results in yeast interaction experiments.

Funding: This research was funded by the Regional Council of Bourgogne- Franche-Comté, the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)”

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

References

1. Pretorius, I.S. Tailoring Wine Yeast for the New Millennium : Novel Approaches to the Ancient Art of Winemaking. *Yeast* **2000**, 16, 675-729, doi : 10.1002/1097-0061(20000615)16 :8<675 : :AID-YEA585>3.0.CO;2-B
2. Fleet, G.H. Wine Yeasts for the Future. *FEMS Yeast Res.* **2008**, 8, 979-995, doi :10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x.
3. Querol, A.; Pérez-Torrado, R.; Alonso-del-Real, J.; Minebois, R.; Stribny, J.; Oliveira, B.M.; Barrio, E. New Trends in the Uses of Yeasts in Oenology. In *Advances in Food and Nutrition Research*; Elsevier : Amsterdam, The Netherlands, **2018**; Volume 85, pp. 177-210, doi:10.1016/bs.afnr.2018.03.002.
4. Ciani, M.; Comitini, F.; Mannazzu, I.; Domizio, P. Controlled Mixed Culture Fermentation : A New Perspective on the Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Winemaking. *FEMS Yeast Res.* **2010**, 10, 123-133, doi :10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x.
5. Albergaria, H.; Arneborg, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in Alcoholic Fermentation Processes : Role of Physiological Fitness and Microbial Interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, 100, 2035-2046, doi:10.1007/s00253-015-7255-0.
6. Binati, R.L.; Innocente, G.; Gatto, V.; Celebrin, A.; Polo, M.; Felis, G.E.; Torriani, S. Exploring the Diversity of a Collection of Native Non-*Saccharomyces* Yeasts to Develop Co-Starter Cultures for Winemaking. *Food Res. Int.* **2019**, 122, 432-442, doi :10.1016/j.foodres.2019.04.043.
7. Rossouw, D.; Bauer, F.F. Exploring the Phenotypic Space of Non-*Saccharomyces* Wine Yeast Biodiversity. *Food Microbiol.* **2016**, 55, 32-46, doi :10.1016/j.fm.2015.11.017.
8. Goold, H.D.; Kroukamp, H.; Williams, T.C.; Paulsen, I.T.; Varela, C.; Pretorius, I.S. Yeast's Balancing Act between Ethanol and Glycerol Production in Low-Alcohol Wines. *Microb. Biotechnol.* **2017**, 10, 264-278, doi :10.1111/1751-7915.12488.
9. Alonso-del-Real, J.; Contreras-Ruiz, A.; Castiglioni, G.L.; Barrio, E.; Querol, A. The Use of Mixed Populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* to Reduce Ethanol Content in Wine : Limited Aeration, Inoculum Proportions, and Sequential Inoculation. *Front. Microbiol.* **2017**, 8, doi :10.3389/fmicb.2017.02087.
10. Alonso-del-Real, J.; Pérez-Torrado, R.; Querol, A.; Barrio, E. Dominance of Wine *Saccharomyces cerevisiae* Strains over *S. kudriavzevii* in Industrial Fermentation Competitions Is Related to an Acceleration of Nutrient Uptake and Utilization. *Env. Microbiol.* **2019**, 21, 1627-1644, doi :10.1111/1462-2920.14536.
11. Varela, C. The Impact of Non-*Saccharomyces* Yeasts in the Production of Alcoholic Beverages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, 100, 9861-9874, doi :10.1007/s00253-016-7941-6.
12. Englezos, V.; Torchio, F.; Cravero, F.; Marengo, F.; Giacosa, S.; Gerbi, V.; Rantsiou, K.; Rolle, L.; Cocolin, L. Aroma Profile and Composition of Barbera Wines Obtained by Mixed Fermentations of *Starmerella bacillaris* (Synonym *Candida zemplinina*) and *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT* **2016**, 73, 567-575, doi :10.1016/j.lwt.2016.06.063.
13. Benito, Á.; Calderón, F.; Benito, S. The Influence of Non-*Saccharomyces* Species on Wine Fermentation Quality Parameters. *Fermentation* **2019**, 5, 54, doi :10.3390/fermentation5030054.
14. Binati, R.L.; Lemos Junior, W.J.F.; Luzzini, G.; Slaghenaufi, D.; Ugliano, M.; Torriani, S. Contribution of Non-*Saccharomyces* Yeasts to Wine Volatile and Sensory Diversity : A Study on *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia Spp.* and *Starmerella bacillaris* Strains Isolated in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, 318, 108470, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108470.
15. Canonico, L.; Solomon, M.; Comitini, F.; Ciani, M.; Varela, C. Volatile Profile of Reduced Alcohol Wines Fermented with Selected Non-*Saccharomyces* Yeasts under Different Aeration Conditions. *Food Microbiol.* **2019**, 84, 103247, doi :10.1016/j.fm.2019.103247.
16. Maturano, Y.P.; Mestre, M.V.; Kuchen, B.; Toro, M.E.; Mercado, L.A.; Vazquez, F.; Combina, M. Optimization of Fermentation-Relevant Factors : A Strategy to Reduce Ethanol in Red Wine by Sequential Culture of Native Yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, 289, 40-48, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.016.
17. Bisson, L.F. Yeast Hybrids in Winemaking. *Catal. Discov. Into Pract.* **2017**, 1, 27-34, doi :10.5344/catalyst.2016.16001.
18. Bellon, J.R.; Ford, C.M.; Borneman, A.R.; Chambers, P.J. A Novel Approach to Isolating Improved Industrial Interspecific Wine Yeasts Using Chromosomal Mutations as Potential Markers for Increased Fitness. *Front. Microbiol.* **2018**, 9, 1442, doi :10.3389/fmicb.2018.01442.
19. Kanter, J.-P.; Benito, S.; Brezina, S.; Beisert, B.; Fritsch, S.; Patz, C.-D.; Rauhut, D. The Impact of Hybrid Yeasts on the Aroma Profile of Cool Climate Riesling Wines. *Food Chem. X* **2020**, 5, 100072, doi :10.1016/j.fochx.2019.100072.
20. Origone, A.C.; Rodríguez, M.E.; Oteiza, J.M.; Querol, A.; Lopes, C.A. *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces uvarum* Hybrids Generated under Different Conditions Share Similar Winemaking Features : Cryotolerant Hybrids for Winemaking in Patagonia. *Yeast* **2018**, 35, 157-171, doi :10.1002/yea.3295.

21. Origone, A.C.; González Flores, M.; Rodríguez, M.E.; Querol, A.; Lopes, C.A. Inheritance of Winemaking Stress Factors Tolerance in *Saccharomyces uvarum*/*S. eubayanus* × *S. cerevisiae* Artificial Hybrids. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *320*, 108500, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108500.
22. Comitini, F.; Capece, A.; Ciani, M.; Romano, P. New Insights on the Use of Wine Yeasts. *Curr. Opin. Food Sci.* **2017**, *13*, 44–49, doi :10.1016/j.cofs.2017.02.005.
23. Rantsiou, K.; Dolci, P.; Giacosa, S.; Torchio, F.; Tofalo, R.; Torriani, S.; Suzzi, G.; Rolle, L.; Cocolin, L. *Candida zemplinina* Can Reduce Acetic Acid Produced by *Saccharomyces cerevisiae* in Sweet Wine Fermentations. *Appl. Env. Microbiol.* **2012**, *78*, 1987–1994, doi :10.1128/AEM.06768-11.
24. Conacher, C.G.; Rossouw, D.; Bauer, F.F.B. Peer Pressure : Evolutionary Responses to Biotic Pressures in Wine Yeasts. *FEMS Yeast Res.* **2019**, *19*, foz072, doi :10.1093/femsyr/foz072.
25. Nissen, P.; Arneborg, N. Characterization of Early Deaths of Non- *Saccharomyces* Yeasts in Mixed Cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **2003**, *180*, 257–263, doi :10.1007/s00203-003-0585-9.
26. Nissen, P.; Nielsen, D.; Arneborg, N. 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* **2003**, *20*, 331–341, doi :10.1002/yea.965.
27. Nissen, P.; Nielsen, D.; Arneborg, N. The Relative Glucose Uptake Abilities of Non-*Saccharomyces* Yeasts Play a Role in Their Coexistence with *Saccharomyces cerevisiae* in Mixed Cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 543–550, doi :10.1007/s00253-003-1487-0.
28. Kemsawasd, V.; Branco, P.; Almeida, M.G.; Caldeira, J.; Albergaria, H.; Arneborg, N. 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.* **2015**, *362*, doi :10.1093/femsle/fnv103.
29. Shekhawat, K.; Bauer, F.F.; Setati, M.E. Impact of Oxygenation on the Performance of Three Non-*Saccharomyces* Yeasts in Co-Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 2479–2491, doi :10.1007/s00253-016-8001-y.
30. Holm Hansen, E.; Nissen, P.; Sommer, P.; Nielsen, J.C.; Arneborg, N. The Effect of Oxygen on the Survival of Non-*Saccharomyces* Yeasts during Mixed Culture Fermentations of Grape Juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 541–547, doi :10.1046/j.1365-2672.2001.01426.x.
31. Kapsopoulou, K.; Mourtzini, A.; Anthoulas, M.; Nerantzis, E. Biological Acidification during Grape Must Fermentation Using Mixed Cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *23*, 735–739, doi :10.1007/s11274-006-9283-5.
32. Comitini, F.; Gobbi, M.; Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. Selected Non-*Saccharomyces* Wine Yeasts in Controlled Multistarter Fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 873–882, doi :10.1016/j.fm.2010.12.001.
33. Gobbi, M.; Comitini, F.; Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. *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.* **2013**, *33*, 271–281, doi :10.1016/j.fm.2012.10.004.
34. Benito, Á.; Calderón, F.; Palomero, F.; Benito, S.; Benito, Á.; Calderón, F.; Palomero, F.; Benito, S. Combine Use of Selected *SchizoSaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* Yeast Strains as an Alternative to The Traditional Malolactic Fermentation in Red Wine Production. *Molecules* **2015**, *20*, 9510–9523, doi :10.3390/molecules20069510.
35. Benito, Á.; Calderón, F.; Benito, S. The Combined Use of *SchizoSaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans*—Effect on the Anthocyanin Wine Composition. *Molecules* **2017**, *22*, 739, doi :10.3390/molecules22050739.
36. Whitener, M.E.B.; Stanstrup, J.; Carlin, S.; Divol, B.; Du Toit, M.; Vrhovsek, U. Effect of Non-*Saccharomyces* Yeasts on the Volatile Chemical Profile of Shiraz Wine : Shiraz Wines Fermented by Non-*Saccharomyces* Yeasts. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2017**, *23*, 179–192, doi :10.1111/ajgw.12269.
37. Escribano-Viana, R.; González-Arenzana, L.; Portu, J.; Garijo, P.; López-Alfaro, I.; López, R.; Santamaría, P.; Gutiérrez, A.R. Wine Aroma Evolution throughout Alcoholic Fermentation Sequentially Inoculated with Non-*Saccharomyces/Saccharomyces* Yeasts. *Food Res. Int.* **2018**, *112*, 17–24, doi :10.1016/j.foodres.2018.06.018.
38. Benito, S.; Hofmann, T.; Laier, M.; Lochbühler, B.; Schüttler, A.; Ebert, K.; Fritsch, S.; Röcker, J.; Rauhut, D. Effect on Quality and Composition of Riesling Wines Fermented by Sequential Inoculation with Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* **2015**, *241*, 707–717, doi :10.1007/s00217-015-2497-8.
39. Balikci, E.K.; Tanguler, H.; Jolly, N.P.; Erten, H. Influence of *Lachancea thermotolerans* on Cv. Emir Wine Fermentation : *Lachancea thermotolerans* Affects Wine Fermentation. *Yeast* **2016**, *33*, 313–321, doi :10.1002/yea.3166.

40. Benito, Á.; Calderón, F.; Palomero, F.; Benito, S.; Quality and Composition of Airen Wines Fermented by Sequential Inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* **2016**, *54*, doi :10.17113/ftb.54.02.16.4220.
41. Beckner Whitener, M.E.; Stanstrup, J.; Panzeri, V.; Carlin, S.; Divol, B.; Du Toit, M.; Vrhovsek, U. Untangling the Wine Metabolome by Combining Untargeted SPME-GCxGC-TOF-MS and Sensory Analysis to Profile Sauvignon Blanc Co-Fermented with Seven Different Yeasts. *Metabolomics* **2016**, *12*, 53, doi :10.1007/s11306-016-0962-4.
42. Escott, C.; Loira, I.; Morata, A.; Bañuelos, M.A.; Suárez-Lepe, J.A. Wine Spoilage Yeasts : Control Strategy. In *Yeast—Industrial Applications*; doi :10.5772/intechopen.69942.
43. Shekhawat, K.; Porter, T.J.; Bauer, F.F.; Setati, M.E. Employing Oxygen Pulses to Modulate *Lachancea thermotolerans*-*Saccharomyces cerevisiae* Chardonnay Fermentations. *Ann. Microbiol.* **2018**, *68*, 93-102, doi :10.1007/s13213-017-1319-6.
44. Dutraive, O.; Benito, S.; Fritsch, S.; Beisert, B.; Patz, C.-D.; Rauhut, D. Effect of Sequential Inoculation with Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* Yeasts on Riesling Wine Chemical Composition. *Fermentation* **2019**, *5*, 79, doi :10.3390/fermentation5030079.
45. Morales, M.L.; Fierro-Risco, J.; Ríos-Reina, R.; Ubeda, C.; Paneque, P. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* Co-Inoculation on Volatile Profile in Fermentations of a Must with a High Sugar Content. *Food Chem.* **2019**, *276*, 427-435, doi :10.1016/j.foodchem.2018.10.041.
46. Petitgonnet, C.; Klein, G.L.; Roullier-Gall, C.; Schmitt-Kopplin, P.; Quintanilla-Casas, B.; Vichi, S.; Julien-David, D.; Alexandre, H. Influence of Cell-Cell Contact between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* on Yeast Interactions and the Exo-Metabolome. *Food Microbiol.* **2019**, *83*, 122-133, doi :10.1016/j.fm.2019.05.005.
47. Sadoudi, M.; Tourdot-Maréchal, R.; Rousseaux, S.; Steyer, D.; Gallardo-Chacón, J.-J.; Ballester, J.; Vichi, S.; Guérin-Schneider, R.; Caixach, J.; Alexandre, H. 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.* **2012**, *32*, 243-253, doi :10.1016/j.fm.2012.06.006.
48. Andorrà, I.; Berradre, M.; Rozès, N.; Mas, A.; Guillamón, J.M.; Esteve-Zarzoso, B. Effect of Pure and Mixed Cultures of the Main Wine Yeast Species on Grape Must Fermentations. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *231*, 215-224, doi :10.1007/s00217-010-1272-0.
49. Nisiotou, A.; Sgouros, G.; Mallouchos, A.; Nisiotis, C.-S.; Michaelidis, C.; Tassou, C.; Banilas, G. The Use of Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* Strains as a Tool to Create Chemical Complexity in Local Wines. *Food Res. Int.* **2018**, *111*, 498-508, doi :10.1016/j.foodres.2018.05.035.
50. Lage, P.; Barbosa, C.; Mateus, B.; Vasconcelos, I.; Mendes-Faia, A.; Mendes-Ferreira, A. *H. guilliermondii* Impacts Growth Kinetics and Metabolic Activity of *Saccharomyces cerevisiae*: The Role of Initial Nitrogen Concentration. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *172*, 62-69, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.031.
51. Taillandier, P.; Lai, Q.P.; Julien-Ortiz, A.; Brandam, C. Interactions between *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in Wine Fermentation : Influence of Inoculation and Nitrogen Content. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 1959-1967, doi :10.1007/s11274-014-1618-z.
52. Pereznevado, F.; Albergaria, H.; Hogg, T.; Girio, F. Cellular Death of Two Non-*Saccharomyces* Wine-Related Yeasts during Mixed Fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.012.
53. Arroyo-López, F.N.; Orlić, S.; Querol, A.; Barrio, E. Effects of Temperature, PH and Sugar Concentration on the Growth Parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and Their Interspecific Hybrid. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *131*, 120-127, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.035.
54. Kemsawasd, V.; Viana, T.; Ardö, Y.; Arneborg, N. Influence of Nitrogen Sources on Growth and Fermentation Performance of Different Wine Yeast Species during Alcoholic Fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 10191-10207, doi :10.1007/s00253-015-6835-3.
55. Gobert, A.; Tourdot-Maréchal, R.; Morge, C.; Sparrow, C.; Liu, Y.; Quintanilla-Casas, B.; Vichi, S.; Alexandre, H. Non-*Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences : Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, doi :10.3389/fmicb.2017.02175.
56. Gobert, A.; Tourdot-Maréchal, R.; Sparrow, C.; Morge, C.; Alexandre, H. Influence of Nitrogen Status in Wine Alcoholic Fermentation. *Food Microbiol.* **2019**, *83*, 71-85, doi :10.1016/j.fm.2019.04.008.
57. Englezos, V.; Cocolin, L.; Rantsiou, K.; Ortiz-Julien, A.; Bloem, A.; Dequin, S.; Camarasa, C. Specific Phenotypic Traits of *Starmerella bacillaris* Related to Nitrogen Source Consumption and Central Carbon Metabolite Production during Wine Fermentation. *Appl. Env. Microbiol.* **2018**, *84*, doi :10.1128/AEM.00797-18.
58. Vendramini, C.; Beltran, G.; Nadai, C.; Giacomini, A.; Mas, A.; Corich, V. The Role of Nitrogen Uptake on the Competition Ability of Three Vineyard *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *258*, 1-11, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.006.

59. González, B.; Vázquez, J.; Morcillo-Parra, M.Á.; Mas, A.; Torija, M.J.; Beltran, G. The Production of Aromatic Alcohols in Non-*Saccharomyces* Wine Yeast Is Modulated by Nutrient Availability. *Food Microbiol.* **2018**, *74*, 64–74, doi :10.1016/j.fm.2018.03.003.
60. Englezos, V.; Rantsiou, K.; Cravero, F.; Torchio, F.; Giacosa, S.; Ortiz-Julien, A.; Gerbi, V.; Rolle, L.; Cocolin, L. Volatile Profiles and Chromatic Characteristics of Red Wines Produced with *Starmarella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.* **2018**, *109*, 298–309, doi :10.1016/j.foodres.2018.04.027.
61. Bely, M.; Sablayrolles, J.-M.; Barre, P. Automatic Detection of Assimilable Nitrogen Deficiencies during Alcoholic Fermentation in Oenological Conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **1990**, *70*, 246–252, doi :10.1016/0922-338X90057-4.
62. Englezos, V.; Rantsiou, K.; Torchio, F.; Rolle, L.; Gerbi, V.; Cocolin, L. Exploitation of the Non-*Saccharomyces* Yeast *Starmarella bacillaris* (Synonym *Candida zemplinina*) in Wine Fermentation : Physiological and Molecular Characterizations. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *199*, 33–40, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.009.
63. Tristezza, M.; Tufariello, M.; Capozzi, V.; Spano, G.; Mita, G.; Grieco, F. The Oenological Potential of *Hanseniaspora warum* in Simultaneous and Sequential Co-Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi :10.3389/fmicb.2016.00670.
64. Albertin, W.; Zimmer, A.; Miot-Sertier, C.; Bernard, M.; Coulon, J.; Moine, V.; Colonna-Ceccaldi, B.; Bely, M.; Marullo, P.; Masneuf-Pomarede, I. Combined Effect of the *Saccharomyces cerevisiae* Lag Phase and the Non-*Saccharomyces* Consortium to Enhance Wine Fruitiness and Complexity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 7603–7620, doi :10.1007/s00253-017-8492-1.
65. Wang, C.; Mas, A.; Esteve-Zarzoso, B. The Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and Non-*Saccharomyces* Yeast during Alcoholic Fermentation Is Species and Strain Specific. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi :10.3389/fmicb.2016.00502.
66. Benito, Á.; Calderón, F.; Benito, S. Mixed Alcoholic Fermentation of *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* and Its Influence on Mannose-Containing Polysaccharides Wine Composition. *AMB Expr.* **2019**, *9*, 17, doi :10.1186/s13568-019-0738-0.
67. Englezos, V.; Cravero, F.; Torchio, F.; Rantsiou, K.; Ortiz-Julien, A.; Lambri, M.; Gerbi, V.; Rolle, L.; Cocolin, L. Oxygen Availability and Strain Combination Modulate Yeast Growth Dynamics in Mixed Culture Fermentations of Grape Must with *Starmarella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **2018**, *69*, 179–188, doi :10.1016/j.fm.2017.08.007.
68. Englezos, V.; Rantsiou, K.; Giacosa, S.; Río Segade, S.; Rolle, L.; Cocolin, L. Cell-to-Cell Contact Mechanism Modulates *Starmarella bacillaris* Death in Mixed Culture Fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *289*, 106–114, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.009.
69. Englezos, V.; Pollon, M.; Rantsiou, K.; Ortiz-Julien, A.; Botto, R.; Río Segade, S.; Giacosa, S.; Rolle, L.; Cocolin, L. *Saccharomyces cerevisiae*-*Starmarella bacillaris* Strains Interaction Modulates Chemical and Volatile Profile in Red Wine Mixed Fermentations. *Food Res. Int.* **2019**, *122*, 392–401, doi :10.1016/j.foodres.2019.03.072.
70. Wang, C.; García-Fernández, D.; Mas, A.; Esteve-Zarzoso, B. Fungal Diversity in Grape Must and Wine Fermentation Assessed by Massive Sequencing, Quantitative PCR and DGGE. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, doi :10.3389/fmicb.2015.01156.
71. Branco, P.; Kemsawasd, V.; Santos, L.; Diniz, M.; Caldeira, J.; Almeida, M.G.; Arneborg, N.; Albergaria, H. *Saccharomyces cerevisiae* Accumulates GAPDH-Derived Peptides on Its Cell Surface That Induce Death of Non-*Saccharomyces* Yeasts by Cell-to-Cell Contact. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2017**, *93*, doi :10.1093/femsec/fix055.
72. Andorrà, I.; Landi, S.; Mas, A.; Esteve-Zarzoso, B.; Guillamón, J.M. Effect of Fermentation Temperature on Microbial Population Evolution Using Culture-Independent and Dependent Techniques. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 773–779, doi :10.1016/j.foodres.2009.11.014.
73. Goddard, M.R. Quantifying The Complexities Of *Saccharomyces cerevisiae*'s Ecosystem Engineering Via Fermentation. *Ecology* **2008**, *89*, 2077–2082, doi :10.1890/07-2060.1.
74. Arroyo-López, F.N.; Pérez-Través, L.; Querol, A.; Barrio, E. Exclusion of *Saccharomyces kudriavzevii* from a Wine Model System Mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2011**, *28*, 423–435, doi :10.1002/yea.1848.
75. Bely, M.; Renault, P.; Moine, V.; Coulon, J.; Sicard, D.; de Vienne, D.; Marullo, P. Non-Conventional Yeasts and Alcohol Levels Reduction. *Alcohol Level Reduct. Wine* **2013**, *6*, 33–37.
76. Alonso-del-Real, J.; Lairón-Peris, M.; Barrio, E.; Querol, A. Effect of Temperature on the Prevalence of *Saccharomyces Non cerevisiae* Species against a *S. cerevisiae* Wine Strain in Wine Fermentation : Competition, Physiological Fitness, and Influence in Final Wine Composition. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, doi :10.3389/fmicb.2017.00150.
77. Salvadó, Z.; Arroyo-López, F.N.; Barrio, E.; Querol, A.; Guillamón, J.M. Quantifying the Individual Effects of Ethanol and Temperature on the Fitness Advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 1155–1161, doi :10.1016/j.fm.2011.03.008.

78. Maturano, Y.P.; Mestre, M.V.; Combina, M.; Toro, M.E.; Vazquez, F.; Esteve-Zarzoso, B. Culture-Dependent and Independent Techniques to Monitor Yeast Species during Cold Soak Carried out at Different Temperatures in Winemaking. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *237*, 142–149, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.013.
79. Englezos, V.; Rantsiou, K.; Cravero, F.; Torchio, F.; Pollon, M.; Fracassetti, D.; Ortiz-Julien, A.; Gerbi, V.; Rolle, L.; Coccolin, L. Volatile Profile of White Wines Fermented with Sequential Inoculation of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem.* **2018**, *257*, 350–360, doi :10.1016/j.foodchem.2018.03.018.
80. Bagheri, B.; Bauer, F.F.; Cardinali, G.; Setati, M.E. Ecological Interactions Are a Primary Driver of Population Dynamics in Wine Yeast Microbiota during Fermentation. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4911, doi :10.1038/s41598-020-61690-z.
81. Perrone, B.; Giacosa, S.; Rolle, L.; Coccolin, L.; Rantsiou, K. Investigation of the Dominance Behavior of *Saccharomyces cerevisiae* Strains during Wine Fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *165*, 156–162, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.023.
82. Pallmann, C.L.; Brown, J.A.; Olineka, T.L.; Coccolin, L.; Mills, D.A.; Bisson, L.F. Use of WL Medium to Profile Native Flora Fermentations. *Am. J. Enology Viticulture* **2001**, *52*, 198–203.
83. Polizzotto, G.; Barone, E.; Ponticello, G.; Fasciana, T.; Barbera, D.; Corona, O.; Amore, G.; Giammanco, A.; Oliva, D. Isolation, Identification and Oenological Characterization of Non-*Saccharomyces* Yeasts in a Mediterranean Island. *Lett. Appl. Microbiol.* **2016**, *63*, 131–138, doi :10.1111/14am.12599.
84. Shekhawat, K.; Patterton, H.; Bauer, F.F.; Setati, M.E. RNA-Seq Based Transcriptional Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* in Mixed-Culture Fermentations under Anaerobic Conditions. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 145, doi :10.1186/s12864-019-5511-x.
85. Albergaria, H.; Francisco, D.; Gori, K.; Arneborg, N.; Gírio, F. *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 885 Secretes Peptides That Inhibit the Growth of Some Non-*Saccharomyces* Wine-Related Strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 965–972, doi :10.1007/s00253-009-2409-6.
86. Branco, P.; Francisco, D.; Monteiro, M.; Almeida, M.G.; Caldeira, J.; Arneborg, N.; Prista, C.; Albergaria, H. Antimicrobial Properties and Death-Inducing Mechanisms of Saccharomycin, a Biocide Secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 159–171, doi :10.1007/s00253-016-7755-6.
87. Sadoudi, M.; Rousseaux, S.; David, V.; Alexandre, H.; Tourdot-Maréchal, R. *Metschnikowia pulcherrima* Influences the Expression of Genes Involved in PDH Bypass and Glyceropyruvic Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1137, doi :10.3389/fmicb.2017.01137.
88. Curiel, J.A.; Morales, P.; Gonzalez, R.; Tronchoni, J. Different Non-*Saccharomyces* Yeast Species Stimulate Nutrient Consumption in *S. cerevisiae* Mixed Cultures. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, doi :10.3389/fmicb.2017.02121.
89. Tronchoni, J.; Curiel, J.A.; Morales, P.; Torres-Pérez, R.; Gonzalez, R. Early Transcriptional Response to Biotic Stress in Mixed Starter Fermentations Involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii*. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *241*, 60–68, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.017.
90. García, M.; Esteve-Zarzoso, B.; Arroyo, T. Non-*Saccharomyces* Yeasts : Biotechnological Role for Wine Production. In *Grape and Wine Biotechnology*; **2016**, doi :10.5772/64957.
91. Branco, P.; Viana, T.; Albergaria, H.; Arneborg, N. Antimicrobial Peptides (AMPs) Produced by *Saccharomyces cerevisiae* Induce Alterations in the Intracellular pH, Membrane Permeability and Culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* Cells. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *205*, 112–118, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.015.
92. Zupan, J.; Avbelj, M.; Butinar, B.; Kosel, J.; Šergan, M.; Raspor, P. Monitoring of Quorum-Sensing Molecules during Minifermentation Studies in Wine Yeast. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2496–2505, doi :10.1021/jf3051363.
93. Longin, C.; Petitgonnet, C.; Guilloux-Benatier, M.; Rousseaux, S.; Alexandre, H. Application of Flow Cytometry to Wine Microorganisms. *Food Microbiol.* **2017**, *62*, 221–231, doi :10.1016/j.fm.2016.10.023.
94. Pérez-Torrado, R.; Rantsiou, K.; Perrone, B.; Navarro-Tapia, E.; Querol, A.; Coccolin, L. Ecological Interactions among *Saccharomyces cerevisiae* Strains : Insight into the Dominance Phenomenon. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43603, doi :10.1038/srep43603.
95. Harlé, O.; Legrand, J.; Tesnière, C.; Pradal, M.; Mouret, J.-R.; Nidelet, T. Investigations of the Mechanisms of Interactions between Four Non-Conventional Species with *Saccharomyces cerevisiae* in Oenological Conditions. *Microbiology* **2018**, doi :10.1101/363531. preprint
96. Wang, C.; Esteve-Zarzoso, B.; Mas, A. 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.* **2014**, *191*, 1–9, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.014.
97. García, M.; Esteve-Zarzoso, B.; Crespo, J.; Cabellos, J.M.; Arroyo, T. 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.* **2017**, 8, doi :10.3389/fmicb.2017.02520.
98. Branco, P.; Albergaria, H.; Arneborg, N.; Prista, C. Effect of GAPDH-Derived Antimicrobial Peptides on Sensitive Yeasts Cells : Membrane Permeability, Intracellular PH and H⁺-Influx/-Efflux Rates. *FEMS Yeast Res.* **2018**, 18, doi :10.1093/femsyr/foy030.
99. Branco, P.; Monteiro, M.; Moura, P.; Albergaria, H. 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.* **2012**, 158, 49-57, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.020.
100. Andorrà, I.; Esteve-Zarzoso, B.; Guillamón, J.M.; Mas, A. Determination of Viable Wine Yeast Using DNA Binding Dyes and Quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, 144, 257-262, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.003.
101. Branco, P.; Francisco, D.; Chambon, C.; Hébraud, M.; Arneborg, N.; Almeida, M.G.; Caldeira, J.; Albergaria, H. Identification of Novel GAPDH-Derived Antimicrobial Peptides Secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and Involved in Wine Microbial Interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, 98, 843-853, doi :10.1007/s00253-013-5411-y.
102. Roullier-Gall, C.; David, V.; Hemmler, D.; Schmitt-Kopplin, P.; Alexandre, H. Exploring yeast interactions through metabolic profiling. *Sci. Rep.* **2020**, 106073, doi :10.1038/s41598-020-63182-6.
103. Albergaria, H.; Branco, P.; Francisco, D.; Coutinho, R.; Monteiro, M.; Malfeito-Ferreira, M.; Arneborg, N.; Almeida, M.G.; Caldeira, J. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentations : Secretion of antimicrobial peptides and microbial interactions. In Proceedings of the 2nd International Conference on Microbial Diversity : Microbial interactions in complex ecosystems, Turin, Italy, 23-25 October **2013**; pp. 98-101.
104. Chlup, P.H.; Bernard, D.; Stewart, G.G. Disc Stack Centrifuge Operating Parameters and Their Impact on Yeast Physiology. *J. Inst. Brew.* **2008**, 114, 45-61, doi :10.1002/j.2050-0416.2008.tb00305.x.
105. Di Cagno, R.; De Angelis, M.; Coda, R.; Minervini, F.; Gobbetti, M. Molecular Adaptation of Sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400 under Co-Cultivation with Other Lactobacilli. *Res. Microbiol.* **2009**, 160, 358-366, doi :10.1016/j.resmic.2009.04.006.
106. Lopez, C.L.F.; Beaufort, S.; Brandam, C.; Taillandier, P. Interactions between *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in Tequila Must Type Medium Fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, 30, 2223-2229, doi :10.1007/s11274-014-1643-y.
107. Renault, P.E.; Albertin, W.; Bely, M. An Innovative Tool Reveals Interaction Mechanisms among Yeast Populations under Oenological Conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 4105-4119, doi :10.1007/s00253-012-4660-5.
108. Rossouw, D.; Meiring, S.P.; Bauer, F.F. Modifying *Saccharomyces cerevisiae* Adhesion Properties Regulates Yeast Ecosystem Dynamics. *mSphere* **2018**, 3, doi :10.1128/mSphere.00383-18.
109. Rossouw, D.; Bagheri, B.; Setati, M.E.; Bauer, F.F. Co-Flocculation of Yeast Species, a New Mechanism to Govern Population Dynamics in Microbial Ecosystems. *PLoS ONE* **2015**, 10, e0136249, doi :10.1371/journal.pone.0136249.
110. Caldeira, J.; Almeida, G.; Macedo, A.L.; Silva, J.P.M.; Albergaria, H. Saccharomycin, a Biocide From *S. cerevisiae* That Kill-off Other Yeasts. *Ann. Med.* **2019**, 51 (Suppl. 1), 94-95, doi :10.1080/07853890.2018.1562694.
111. Govender, P.; Kroppenstedt, S.; Bauer, F.F. Novel Wine-Mediated FLO11 Flocculation Phenotype of Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains with Modified FLO Gene Expression : Wine-Mediated FLO11 Flocculation Phenotype. *FEMS Microbiol. Lett.* **2011**, 317, 117-126, doi :10.1111/j.1574-6968.2011.02219.x.
112. Barbosa, C.; Mendes-Faia, A.; Lage, P.; Mira, N.P.; Mendes-Ferreira, A. Genomic Expression Program of *Saccharomyces cerevisiae* along a Mixed-Culture Wine Fermentation with *Hanseniaspora guilliermondii*. *Microbiol. Cell Fact* **2015**, 14, 124, doi :10.1186/s12934-015-0318-1.
113. Peng, C.; Andersen, B.; Arshid, S.; Larsen, M.R.; Albergaria, H.; Lametsch, R.; Arneborg, N. Proteomics Insights into the Responses of *Saccharomyces cerevisiae* during Mixed-Culture Alcoholic Fermentation with *Lachancea thermotolerans*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2019**, 95, fiz126, doi :10.1093/femsec/fiz126.
114. Sieuwerts, S.; de Bok, F.A.M.; Mols, E.; de Vos, W.M.; van Hylckama Vlieg, J.E.T. A Simple and Fast Method for Determining Colony Forming Units. *Lett. Appl. Microbiol.* **2008**, 47, 275-278, doi :10.1111/j.1472-765X.2008.02417.x.
115. Hertkorn, N.; Harir, M.; Koch, B.P.; Michalke, B.; Schmitt-Kopplin, P. High-Field NMR Spectroscopy and FTICR Mass Spectrometry : Powerful Discovery Tools for the Molecular Level Characterization of Marine Dissolved Organic Matter. *Biogeosciences* **2013**, 10, 1583-1624, doi :10.5194/bg-10-1583-2013.
116. López-Malo, M.; Querol, A.; Guillamon, J.M. Metabolomic Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the Cryotolerant Species *S. bayanus* Var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during Wine Fermentation at Low Temperature. *PLoS ONE* **2013**, 8, e60135, doi :10.1371/journal.pone.0060135.
117. Mazzei, P.; Spaccini, R.; Francesca, N.; Moschetti, G.; Piccolo, A. Metabolomic by 1 H NMR Spectroscopy Differentiates "Fiano Di Avellino" White Wines Obtained with Different Yeast Strains. *J. Agric.*

- Food Chem. **2013**, 61, 10816-10822, doi :10.1021/jf403567x.
118. Alves, Z.; Melo, A.; Figueiredo, A.R.; Coimbra, M.A.; Gomes, A.C.; Rocha, S.M. Exploring the *Saccharomyces cerevisiae* Volatile Metabolome: Indigenous versus Commercial Strains. PLoS ONE **2015**, 10, e0143641, doi :10.1371/journal.pone.0143641.
119. Casu, F.; Pinu, F.R.; Fedrizzi, B.; Greenwood, D.R.; Villas-Boas, S.G. The Effect of Linoleic Acid on the Sauvignon Blanc Fermentation by Different Wine Yeast Strains. FEMS Yeast Res. **2016**, 16, fow050, doi :10.1093/femsyr/fow050.
120. Howell, K.S.; Cozzolino, D.; Bartowsky, E.J.; Fleet, G.H.; Henschke, P.A. Metabolic Profiling as a Tool for Revealing *Saccharomyces* Interactions during Wine Fermentation. FEMS Yeast Res. **2006**, 6, 91-101, doi :10.1111/j.1567-1364.2005.00010.x.
121. Peng, C.; Viana, T.; Petersen, M.A.; Larsen, F.H.; Arneborg, N. Metabolic Footprint Analysis of Metabolites That Discriminate Single and Mixed Yeast Cultures at Two Key Time-Points during Mixed Culture Alcoholic Fermentations. Metabolomics **2018**, 14, doi :10.1007/s11306-018-1391-3.
122. Liu, P.-T.; Lu, L.; Duan, C.-Q.; Yan, G.-L. The Contribution of Indigenous Non-*Saccharomyces* Wine Yeast to Improved Aromatic Quality of Cabernet Sauvignon Wines by Spontaneous Fermentation. LWT Food Sci. Technol. **2016**, 71, 356-363, doi :10.1016/j.lwt.2016.04.031.
123. King, E.S.; Swiegers, J.H.; Travis, B.; Francis, I.L.; Bastian, S.E.P.; Pretorius, I.S. Coinoculated Fermentations Using *Saccharomyces* Yeasts Affect the Volatile Composition and Sensory Properties of Vitis Vinifera L. Cv. Sauvignon Blanc Wines. J. Agric. Food Chem. **2008**, 56, 10829-10837, doi :10.1021/jf801695h.
124. Richter, C.L.; Kennedy, A.D.; Guo, L.; Dokoozlian, N. Metabolomic Measurements at Three Time Points of a Chardonnay Wine Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. Am. J. Enol. Vitic. **2015**, 66, 294-301, doi :10.5344/ajev.2015.14062.
125. Tejero Rioseras, A.; Garcia Gomez, D.; Ebert, B.E.; Blank, L.M.; Ibáñez, A.J.; Sinues, P.M.-L. Comprehensive Real-Time Analysis of the Yeast Volatilome. Sci. Rep. **2017**, 7, doi :10.1038/s41598-017-14554-y.
126. Aurich, M.K. Prediction of Intracellular Metabolic States from Extracellular Metabolomic Data. Metabolomics **2015**, 11, 603-619.
127. Mashego, M.R.; Rumbold, K.; De Mey, M.; Vandamme, E.; Soetaert, W.; Heijnen, J.J. Microbial Metabolomics: Past, Present and Future Methodologies. Biotechnol. Lett. **2007**, 29, 1-16, doi :10.1007/s10529-006-9218-0.
128. Patti, G.J.; Yanes, O.; Siuzdak, G. Metabolomics: The Apogee of the Omics Trilogy. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2012**, 13, 263-269, doi :10.1038/nrm3314.
129. Roullier-Gall, C.; Witting, M.; Tziotis, D.; Ruf, A.; Gougeon, R.D.; Schmitt-Kopplin, P. Integrating Analytical Resolutions in Non-Targeted Wine Metabolomics. Tetrahedron **2015**, 71, 2983-2990, doi :10.1016/j.tet.2015.02.054.
130. López-Rituerto, E.; Savorani, F.; Avenoza, A.; Busto, J.H.; Peregrina, J.M.; Engelsen, S.B. Investigations of La Rioja Terroir for Wine Production Using 1 H NMR Metabolomics. J. Agric. Food Chem. **2012**, 60, 3452-3461, doi :10.1021/jf204361d.
131. Godelmann, R.; Fang, F.; Humpfer, E.; Schütz, B.; Bansbach, M.; Schäfer, H.; Spraul, M. Targeted and Nontargeted Wine Analysis by 1 H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage. J. Agric. Food Chem. **2013**, 61, 5610-5619, doi :10.1021/jf400800d.
132. Son, H.-S.; Kim, K.M.; van den Berg, F.; Hwang, G.-S.; Park, W.-M.; Lee, C.-H.; Hong, Y.-S. 1 H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Characterization of Wines by Grape Varieties and Production Areas. J. Agric. Food Chem. **2008**, 56, 8007-8016, doi :10.1021/jf801424u.
133. Son, H.-S.; Hwang, G.-S.; Kim, K.M.; Kim, E.-Y.; van den Berg, F.; Park, W.-M.; Lee, C.-H.; Hong, Y.-S. 1 H NMR-Based Metabolomic Approach for Understanding the Fermentation Behaviors of Wine Yeast Strains. Anal. Chem. **2009**, 81, 1137-1145, doi :10.1021/ac802305c.
134. Minnaar, P.P.; du Plessis, H.W.; Paulsen, V.; Ntushelo, N.; Jolly, N.P.; du Toit, M. *Saccharomyces cerevisiae*, Non-*Saccharomyces* Yeasts and Lactic Acid Bacteria in Sequential Fermentations: Effect on Phenolics and Sensory Attributes of South African Syrah Wines. South Afr. J. Enol. Vitic. **2017**, 38, doi :10.21548/38-2-1621.
135. Nardi, T.; Panero, L.; Petrozziello, M.; Guaita, M.; Tsolakis, C.; Cassino, C.; Vagnoli, P.; Bosso, A. Managing Wine Quality Using *Torulopsis delbrueckii* and *Oenococcus oeni* Starters in Mixed Fermentations of a Red Barbera Wine. Eur. Food Res. Technol. **2019**, 245, 293-307, doi :10.1007/s00217-018-3161-x.
136. Ebert, B. E.; Halbfeld, C.; Blank, L. M. Exploration and Exploitation of the Yeast Volatilome. CMB **2017**, 5, doi :10.2174/2213235X04666160818151119.
137. Escribano, R.; González-Arenzana, L.; Portu, J.; Garijo, P.; López-Alfaro, I.; López, R.; Santamaría, P.; Gutiérrez, A.R. Wine Aromatic Compound Production and Fermentative Behaviour within Different Non-*Saccharomyces* Species and Clones. J. Appl. Microbiol. **2018**, 124, 1521-1531, doi :10.1111/jam.13735.
138. Englezos, V.; Cachón, D.C.; Rantsiou, K.; Blanco, P.; Petrozziello, M.; Pollon, M.; Giacosa, S.; Río

- Segade, S.; Rolle, L.; Cocolin, L. Effect of Mixed Species Alcoholic Fermentation on Growth and Malolactic Activity of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 7687–7702, doi :10.1007/s00253-019-10064-1.
139. Padilla, B.; Gil, J.V.; Manzanares, P. Past and Future of Non-*Saccharomyces* Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi :10.3389/fmicb.2016.00411.
140. Ferreira, V.; Lopez, R.; Cacho, J.F. Quantitative Determination of the Odorants of Young Red Wines from Different Grape Varieties. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1659–1667, doi :10.1002/1097-001080:11<1659::AID-JSFA693>3.0.CO;2-6.
141. Lytra, G.; Tempere, S.; Revel, G. de; Barbe, J.-C. Impact of Perceptive Interactions on Red Wine Fruity Aroma. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 12260–12269, doi :10.1021/jf302918q.
142. Lytra, G.; Tempere, S.; Le Floch, A.; de Revel, G.; Barbe, J.-C. Study of Sensory Interactions among Red Wine Fruity Esters in a Model Solution. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 8504–8513, doi :10.1021/jf4018405.
143. Varela, C.; Sengler, F.; Solomon, M.; Curtin, C. Volatile Flavour Profile of Reduced Alcohol Wines Fermented with the Non-Conventional Yeast Species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* **2016**, *209*, 57–64, doi :10.1016/j.foodchem.2016.04.024.
144. Hu, K.; Jin, G.-J.; Xu, Y.-H.; Tao, Y.-S. Wine Aroma Response to Different Participation of Selected *Hanseniaspora uvarum* in Mixed Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.* **2018**, *108*, 119–127, doi :10.1016/j.foodres.2018.03.037.
145. Renault, P.; Coulon, J.; de Revel, G.; Barbe, J.-C.; Bely, M. Increase of Fruity Aroma during Mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* Wine Fermentation Is Linked to Specific Esters Enhancement. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *207*, 40–48, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037.
146. Azzolini, M.; Tosi, E.; Lorenzini, M.; Finato, F.; Zapparoli, G. Contribution to the Aroma of White Wines by Controlled *Torulaspora delbrueckii* Cultures in Association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *31*, 277–293, doi :10.1007/s11274-014-1774-1.
147. Nisiotou, A.; Mallouchos, A.; Tassou, C.; Banilas, G. Indigenous Yeast Interactions in Dual-Starter Fermentations May Improve the Varietal Expression of Moschofilero Wine. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, doi :10.3389/fmicb.2019.01712.
148. Tofalo, R.; Patrignani, F.; Lanciotti, R.; Perpetuini, G.; Schirone, M.; Di Gianvito, P.; Pizzoni, D.; Arfelli, G.; Suzzi, G. Aroma Profile of Montepulciano d'Abruzzo Wine Fermented by Single and Co-Culture Starters of Autochthonous *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Yeasts. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi :10.3389/fmicb.2016.00610.
149. Belda, I.; Ruiz, J.; Esteban-Fernández, A.; Navascués, E.; Marquina, D.; Santos, A.; Moreno-Arribas, M. Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules* **2017**, *22*, 189, doi :10.3390/molecules22020189.
150. Maturano, Y.P.; Assaf, M.; Fabani, M.P.; Nally, M.C.; Jofré, V.; Rodríguez Assaf, L.A.; Toro, M.E.; Castellanos de Figueroa, L.I.; Vazquez, F. Enzymatic Activities Produced by Mixed *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Cultures: Relationship with Wine Volatile Composition. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2015**, *108*, 1239–1256, doi :10.1007/s10482-015-0578-0.
151. Anfang, N.; Brajkovich, M.; Goddard, M.R. Co-Fermentation with *Pichia kluyveri* Increases Varietal Thiol Concentrations in Sauvignon Blanc. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2009**, *15*, 1–8, doi :10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x.
152. Oliveira, I.; Ferreira, V. Modulating Fermentative, Varietal and Aging Aromas of Wine Using Non-*Saccharomyces* Yeasts in a Sequential Inoculation Approach. *Microorganisms* **2019**, *7*, 164, doi :10.3390/microorganisms7060164.
153. Bagheri, B.; Zambelli, P.; Vigentini, I.; Bauer, F.F.; Setati, M.E. Investigating the Effect of Selected Non-*Saccharomyces* Species on Wine Ecosystem Function and Major Volatiles. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2018**, *6*, doi :10.3389/fbioe.2018.00169.
154. Mestre, M.V.; Maturano, Y.P.; Gallardo, C.; Combina, M.; Mercado, L.; Toro, M.E.; Carrau, F.; Vazquez, F.; Dellacassa, E. Impact on Sensory and Aromatic Profile of Low Ethanol Malbec Wines Fermented by Sequential Culture of *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* Native Yeasts. *Fermentation* **2019**, *5*, 65, doi :10.3390/fermentation5030065.
155. Zhang, B.-Q.; Luan, Y.; Duan, C.-Q.; Yan, G.-L. 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.* **2018**, *9*, doi :10.3389/fmicb.2018.00606.
156. Varela, C.; Barker, A.; Tran, T.; Borneman, A.; Curtin, C. Sensory Profile and Volatile Aroma Composition of Reduced Alcohol Merlot Wines Fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *252*, 1–9, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.002.
157. Padilla, B.; Zulian, L.; Ferreres, À.; Pastor, R.; Esteve-Zarzoso, B.; Beltran, G.; Mas, A. Sequential Inoculation of Native Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* Strains for Wine Making. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, doi :10.3389/fmicb.2017.01293.

158. Capece, A.; Siesto, G.; Romaniello, R.; Lagreca, V.M.; Pietrafesa, R.; Calabretti, A.; Romano, P. Assessment of Competition in Wine Fermentation among Wild *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Sangiovese Grapes in Tuscany Region. *LWT Food Sci. Technol.* **2013**, *54*, 485–492, doi :10.1016/j.lwt.2013.07.001.
159. Beckner Whitener, M.E.; Carlin, S.; Jacobson, D.; Weighill, D.; Divol, B.; Conterno, L.; Du Toit, M.; Vrhovsek, U. Early Fermentation Volatile Metabolite Profile of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Red and White Grape Must: A Targeted Approach. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *64*, 412–422, doi :10.1016/j.lwt.2015.05.018.
160. Tronchoni, J.; Curiel, J.A.; Sáenz-Navajas, M.P.; Morales, P.; de-la-Fuente-Blanco, A.; Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V.; Gonzalez, R. Aroma Profiling of an Aerated Fermentation of Natural Grape Must with Selected Yeast Strains at Pilot Scale. *Food Microbiol.* **2018**, *70*, 214–223, doi :10.1016/j.fm.2017.10.008.
161. Lambrechts, M.G.; Pretorius, I.S. Yeast and Its Importance to Wine Aroma—A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2000**, *21*, 33.
162. Fleet, G. Yeast Interactions and Wine Flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *86*, 11–22, doi :10.1016/S0168-160500245-9.
163. Styger, G.; Prior, B.; Bauer, F.F. Wine Flavor and Aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 1145–1159, doi :10.1007/s10295-011-1018-4.
164. Bindon, K.A.; Kassara, S.; Solomon, M.; Bartel, C.; Smith, P.A.; Barker, A.; Curtin, C. Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains Significantly Impact Shiraz Tannin and Polysaccharide Composition with Implications for Wine Colour and Astringency. *Biomolecules* **2019**, *9*, 466, doi :10.3390/biom9090466.
165. Lleixà, J.; Manzano, M.; Mas, A.; Portillo, M. del C. *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Competition during Microvinification under Different Sugar and Nitrogen Conditions. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi :10.3389/fmicb.2016.01959.
166. Pineau, B.; Barbe, J.-C.; Van Leeuwen, C.; Dubourdieu, D. Contribution of Grape Skin and Fermentation Microorganisms to the Development of Red- and Black-Berry Aroma in Merlot Wines. *Oeno One* **2011**, *45*, 27, doi :10.20870/oeno-one.2011.45.1.1485.
167. Lytra, G.; Tempere, S.; de Revel, G.; Barbe, J.-C. Distribution and Organoleptic Impact of Ethyl 2-Methylbutanoate Enantiomers in Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 5005–5010, doi :10.1021/jf500670z.
168. Tempere, S.; Hamtat, M.-L.; de Revel, G.; Sicard, G. Comparison of the Ability of Wine Experts and Novices to Identify Odorant Signals: A New Insight in Wine Expertise: Odorant Identification by Experts and Novices. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2016**, *22*, 190–196, doi :10.1111/ajgw.12192.
169. McKay, M.; Bauer, F.F.; Panzeri, V.; Buica, A. Perceptual Interactions and Characterisation of Odour Quality of Binary Mixtures of Volatile Phenols and 2-Isobutyl-3-Methoxypyrazine in a Red Wine Matrix. *J. Wine Res.* **2020**, *31*, 49–66, doi :10.1080/09571264.2020.1723069.
170. Swiegers, J.H.; Bartowsky, E.J.; Henschke, P.A.; Pretorius, I.S. Yeast and Bacterial Modulation of Wine Aroma and Flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 139–173, doi :10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x.
171. Cameleyre, M.; Lytra, G.; Tempere, S.; Barbe, J.-C. Olfactory Impact of Higher Alcohols on Red Wine Fruity Ester Aroma Expression in Model Solution. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 9777–9788, doi :10.1021/acs.jafc.5b03489.
172. Chambers, E.; Koppel, K. Associations of Volatile Compounds with Sensory Aroma and Flavor: The Complex Nature of Flavor. *Molecules* **2013**, *18*, 4887–4905, doi :10.3390/molecules18054887.
173. Tempère, S.; Marchal, A.; Barbe, J.-C.; Bely, M.; Masneuf-Pomarede, I.; Marullo, P.; Albertin, W. The Complexity of Wine: Clarifying the Role of Microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 3995–4007, doi :10.1007/s00253-018-8914-8.
174. Winters, M.; Arneborg, N.; Appels, R.; Howell, K. Can Community-Based Signalling Behaviour in *Saccharomyces cerevisiae* Be Called Quorum Sensing? A Critical Review of the Literature. *FEMS Yeast Res.* **2019**, *19*, foz046, doi :10.1093/femsyr/foz046.
175. Avbelj, M.; Zupan, J.; Kranjc, L.; Raspor, P. Quorum-Sensing Kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: A Symphony of ARO Genes and Aromatic Alcohols. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 8544–8550, doi :10.1021/acs.jafc.5b03400.
176. Šuklje, K.; Carlin, S.; Stanstrup, J.; Antalick, G.; Blackman, J.W.; Meeks, C.; Deloire, A.; Schmidtke, L.M.; Vrhovsek, U. Unravelling Wine Volatile Evolution during Shiraz Grape Ripening by Untargeted HS-SPME-GC × GC-TOFMS. *Food Chem.* **2019**, *277*, 753–765, doi :10.1016/j.foodchem.2018.10.135.
177. Lawson, C.E.; Harcombe, W.R.; Hatzenpichler, R.; Lindemann, S.R.; Löffler, F.E.; O'Malley, M.A.; García Martín, H.; Pflieger, B.F.; Raskin, L.; Venturelli, O.S.; et al. Common Principles and Best Practices for Engineering Microbiomes. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 725–741, doi :10.1038/s41579-019-0255-9

V. Méthodes analytiques

Comme il a été décrit précédemment, les interactions qui surviennent entre micro-organismes en conditions de vinification induisent des modifications de dynamiques des populations et des modifications métaboliques qui contribuent à des modulations de la composition chimique du vin. Aussi, nous avons pu le voir, différentes approches et techniques sont employées pour suivre et évaluer ces aspects. Afin de comprendre les types d'interactions et les mécanismes impliqués, il est essentiel de suivre les dynamiques de populations en présence.

5.1. Dynamique de populations

Les différentes populations levuriennes lors de fermentations mixtes peuvent être suivies et quantifiées par les techniques culturales usuellement employées qui font intervenir la morphologie des colonies ou encore l'utilisation de milieux de croissance sélectifs. Ces techniques malgré des avantages notables (bien connues, simple d'exécution) présentent néanmoins des limites. En effet, ces techniques s'avèrent être longues, laborieuses et ne permettent pas de suivre en temps réel une dynamique de population. De plus, du fait du grand nombre de manipulations, une augmentation des risques de contamination et de possibles biais de manipulation peut être observée. En outre, il a été montré que la cultivabilité des micro-organismes impliqués dans l'élaboration du vin pouvait être frein dans ces études. Enfin, il reste à l'heure actuelle, difficile de discriminer des populations en présence par simple technique culturale (Heard & Fleet, 1986; Pallmann *et al.*, 2001). Des approches de microscopie sont également utilisées pour l'énumération de micro-organismes (Zupan *et al.*, 2013) et l'étude d'interactions physiques cellulaires (Govender *et al.*, 2011; Pérez-Torrado *et al.*, 2017; Rossouw *et al.*, 2015). Cependant, les études se limitent à l'observation de quelques micro-organismes et restent limitantes pour la discrimination des espèces entre elles (Andorrà *et al.*, 2010). Aussi, ces dernières années ont vu se développer des techniques de biologie moléculaire basées sur la PCR (Pincus *et al.*, 2007), permettant d'évaluer la composition qualitative comme la PCR-microsatellite (Vaudano & Garcia-Moruno, 2008) ou encore ITS et quantitative des populations étudiées, parmi elles, la qPCR ou encore la RT-qPCR (Andorrà *et al.*, 2010; C. Wang *et al.*, 2015).

La cytométrie en flux (FCM) se révèle être un outil de choix pour dénombrer en temps réel et de façon automatique, les micro-organismes présents dans la matrice. Ainsi, Longin et collaborateurs recensent en 2017, toutes les applications de la cytométrie en flux aux micro-

organismes du vin (Longin et *al.*, 2017). La cytométrie en flux donne lieu à la détection et quantification rapide des propriétés optiques, telles que la taille, la granularité et la fluorescence des particules dans un milieu liquide. Aussi, il est possible de discriminer des populations au sein d'un écosystème microbien selon les propriétés de fluorescence de chacune d'elle telles que leur auto-fluorescence, un marquage cellulaire fluorescent, ou encore par l'utilisation de fluorochromes.

Chez les levures, le marquage fluorescent est appliqué pour discriminer des espèces ou souches de levures qui présenteraient les mêmes propriétés optiques. En effet, un moyen pour suivre une population cible en culture mixte est d'utiliser un gène rapporteur codant pour une protéine fluorescente. La plus connue d'entre elle est la Green Fluorescent Protein (GFP). Cette dernière lorsqu'elle est exprimée peut alors être détectée par FCM. Dans une étude récente, Petitgonnet et collaborateurs (Petitgonnet et *al.*, 2019) met en évidence un effet inhibiteur d'une souche de *S. cerevisiae* sur une *L. thermotolerans* en suivant leurs dynamiques de populations au long de la fermentation alcoolique grâce à l'utilisation d'une souche de *S. cerevisiae* marquée GFP. En 2020, Conacher et collaborateurs (Conacher et *al.*, 2020), complexifient l'écosystème et étudient un consortium de trois espèces de levures (*S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* et *L. thermotolerans*) en les étiquetant chacune avec une protéine différente (GFP, Blue Fluorescent Protein (BFP) et Red Fluorescent Protein (RFP). Il est également possible d'utiliser cette approche pour discriminer des souches au sein d'une même espèce comme *S. cerevisiae*. Une construction d'une souche *S. cerevisiae*-GFP pour la différencier d'une autre souche de *S. cerevisiae* elle-même marquée avec un gène exprimant une protéine fluorescente rouge (t-dimer2) a été réalisée en 2015, par Marsit et collaborateurs. Cette dernière étude fait également intervenir des fluorochromes permettant d'évaluer certains paramètres physiologiques des micro-organismes en culture dont la viabilité et vitalité cellulaires (Marsit et *al.*, 2015).

En effet, différents fluorochromes spécifiques sont utilisés comme l'iodure de propidium (IP), le syto 9, ou encore la fluorescéine diacétate (FDA) et la carboxy-fluorescéine diacétate (cFDA). La FDA et cFDA sont utilisées comme marqueurs de vitalité avec pour mécanisme commun la mise en évidence d'une activité enzymatique estérase de la cellule marquée signifiant une activité métabolique cellulaire (Bouix & Leveau, 2001; Gobert et *al.*, 2017). A l'inverse, l'IP est un marqueur appliqué pour évaluer l'intégrité membranaire. Ce dernier, va venir s'insérer au niveau des acides nucléiques lorsque la membrane est altérée (Branco et *al.*, 2012; Delobel et *al.*, 2012; Petitgonnet et *al.*, 2019).

Cet outil permet également de déterminer via l'étude de la population viable, la capacité des micro-organismes à s'adapter aux conditions environnementales définies, comme le fitness. Ces conditions environnementales rassemblent, la disponibilité en nutriments, l'espace, les facteurs abiotiques (paramètres physicochimiques du milieu) et enfin biotiques qui comprennent la présence d'autres micro-organismes. Aussi, pour l'étude des interactions il est ainsi possible de comparer les différents paramètres de fitness de la levure en culture pure et en culture mixte. Cette comparaison participe à la caractérisation des phénomènes d'interactions qui interviennent entre les différents micro-organismes.

Cette approche est décrite depuis les années 1949, par le biais de l'étude de la cinétique de croissance (Monod et *al.*, 1949) et aujourd'hui appliquée en œnologie. Selon les études les paramètres ciblés diffèrent. Parmi les paramètres les plus utilisés pour définir le fitness on retrouve le μ_{\max} qui correspond au taux de croissance spécifique maximale (h^{-1}) d'une population, la population maximale ($cellules.ml^{-1}$), le taux de consommation des sucres spécifique maximal ($g.l^{-1}.h^{-1}$) et le temps de dégradation de 50% des sucres (h). Ces paramètres sont parfois mis en jeu dans l'établissement de modèles statistiques. Pour exemple, en 1990, Zwietering et *al.*, propose cette expression pour modéliser les paramètres cinétiques de croissance de levures : $y = D \times \exp \{-\exp[\frac{(\mu_{\max} \times e)}{D} \times (\lambda - t) + 1]\}$ où $y = \ln(DO_t / DO_0)$, DO_0 est la DO initiale, DO_t est la DO au temps t, D est le maximum asymptotique, l'équivalent de $\ln(DO_{\max} / DO_0)$, μ_{\max} est le taux de croissance spécifique maximale (h^{-1}) et λ est la durée de la phase de latence (h).

Aussi, Alonso-del-Real et *al.*, 2017; Williams et *al.*, 2015 appliquent le modèle impliquant le taux de croissance intrinsèque : $N_t = N_0 e^{rt}$ où N_t est la densité cellulaire à un moment donné, N_0 correspond à la densité cellulaire initiale, et t est le moment (en heures) où les deux souches en présence ont atteint leur plus forte densité cellulaire en culture mixte et en monoculture et r le taux de croissance propre de chacune des levures.

L'effet de l'interaction sur les souches impliquées peut être évalué par la différence de leur taux de croissance intrinsèque dans des conditions de culture pure et de culture mixte. La plupart du temps plusieurs modèles sont mis à l'épreuve pour s'harmoniser au mieux avec l'étude expérimentale (Goddard, 2008; Salvadó et *al.*, 2011).

Pour incrémenter le modèle il est également possible d'apporter des informations concernant la consommation des nutriments de chacune des souches en culture simple ou en culture mixte.

Le suivi de la cinétique reste en œnologie le plus commun. Cette information peut découler de différentes analyses communément appelées analyses œnologiques classiques. La plus utilisée reste aujourd'hui l'évaluation de la quantité de CO₂ relarguée au cours de la fermentation alcoolique à partir de la dégradation des sucres par pesée des contenants pour évaluer la cinétique fermentaire des différentes populations. Des techniques enzymatiques, de spectroscopie infrarouge par transformé de Fourier (FTIR) ou de Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) sont également utilisées pour ce suivi de fermentation mais sont également couramment adoptées pour la quantification de composés clés (glycérol, acide malique, sources azotées) dans les process de vinification.

5.2. Analyse du vin

En œnologie comme dans bien d'autres domaines, les méthodes analytiques utilisées peuvent être divisées en deux catégories selon l'approche conceptuelle développée. L'approche ciblée consiste à répondre à une hypothèse formulée par détection et quantification d'un petit nombre de métabolites spécifiques connus. A l'inverse de cette approche, une démarche sans a priori peut être menée, on parle alors d'approche non ciblée. Cette dernière permet à la fois l'étude globale de systèmes biologiques complexes et la génération d'hypothèses. Il est possible de réaliser un profilage métabolique, qui vise à décrire et identifier le métabolome de systèmes étudiés. Cette démarche permet d'établir les empreintes métabolomiques des vins qui seront alors comparées entre elles. D'après ces profils métaboliques, la révélation de biomarqueurs d'intérêt peut permettre de réaliser des prédictions sur la base de modèles statistiques. Enfin, il est possible de contribuer à la connaissance des fonctions de gènes et/ ou leur régulation. Ces démarches présentent toutes les deux des avantages et inconvénients (Tableau 5) et se trouvent de ce fait, complémentaires et essentielles pour comprendre au mieux le métabolome (Dunn et *al.*, 2005; Pinu et *al.*, 2014).

En œnologie, les approches ciblées sont utilisées depuis un grand nombre d'années et restent aujourd'hui majoritaires. Cependant, on observe une évolution des démarches scientifiques pour étudier les systèmes biologiques complexes. Ces démarches englobent des stratégies complètes, d'analyse, de collecte et d'exploitation des données. En effet, la biologie dite « intégrative », à l'inverse de la vision classique, génère des données qui couvrent tous les mécanismes impliqués dans les réseaux cellulaires et permet d'en comprendre leur mode de fonctionnement dans leur globalité.

Tableau 5 : Avantages et inconvénients des différentes approches analytiques (d'après Pinu, 2018)

Approches	Avantages	Inconvénients
Ciblées	<ul style="list-style-type: none"> - Limite de détection très basse - Quantitative - Analyse des données et interprétations plus aisées - Les données extraites peuvent être reliées à des voies métaboliques 	<ul style="list-style-type: none"> - Nombre de composés limité - Composés non ciblés ne sont pas pris en considération - Des standards des composés analysés sont requis pour la phase de quantification
Non ciblées	<ul style="list-style-type: none"> - Objective et exhaustive - Technologie de haut débit - Permet la détection de composés inconnus jusqu'alors ou n'étant pas connu liée à la question biologique 	<ul style="list-style-type: none"> - Semi-quantitative - Grand nombre de faux positifs et faux négatifs - Beaucoup de composés encore inconnus - L'interprétation des données peut s'avérer complexe

Cette nouvelle approche fait intervenir des technologies « omiques » : génomique, transcriptomique, protéomique et la plus récente, la métabolomique (Figure 20). Les scientifiques reconnaissent aujourd'hui que ces strates sont étroitement connectées. L'étude d'un seul niveau ne permet donc pas de rendre compte du fonctionnement cellulaire. Les données générées par la métabolomique reflètent à la fois les caractéristiques de l'expression du génome, du transcriptome et du protéome, faisant d'elle la technologie la plus intégrative du phénotype de l'organisme à l'étude. Elle permet ainsi de décrypter la réponse d'un organisme à des modifications génétiques, ou encore environnementales.

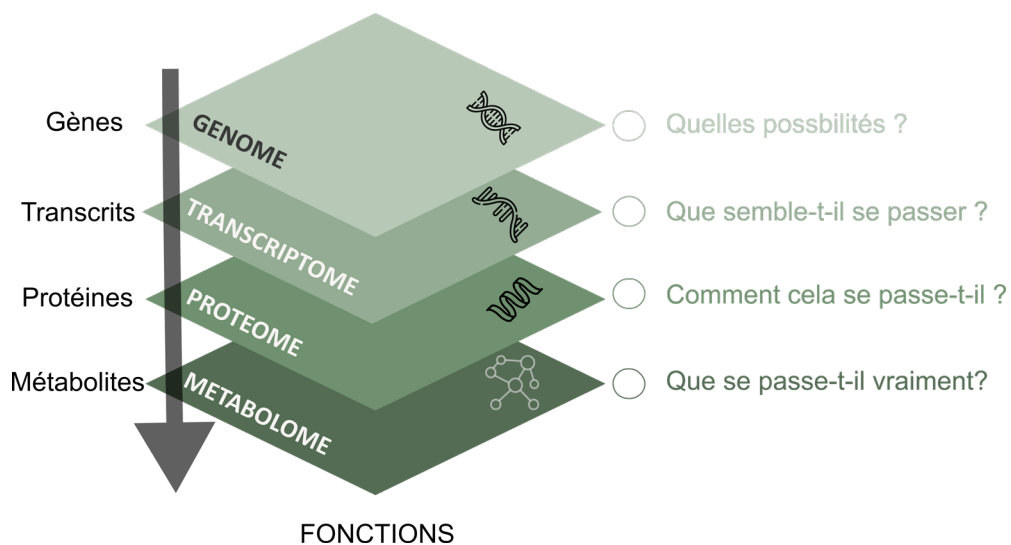


Figure 20 : Schéma des nouvelles technologies omiques

La métabolomique correspond à l'étude des métabolites sécrétés ou excrétés dans l'environnement par un organisme. La somme de l'ensemble de ces molécules de faibles poids moléculaires (< 1500 Da), présents dans un système biologique dans des conditions physiologiques particulières définissent le métabolome. Cette technologie dite à haut débit présente un large champ d'applications de la médecine à l'environnement en passant par les biotechnologies ou encore l'agroalimentaire. En outre, cette approche non ciblée permet de rendre compte de la diversité chimique d'une matrice complexe et de mettre en évidence non seulement des composés connus mais aussi des composés non identifiés auparavant.

En 2001, pour la première fois, Cooper et Marshall applique cette technologie au vin (Cooper & Marshall, 2001). En 2008, le concept d'œnomique émerge (Blow, 2008). Différents types d'études ont ensuite été conduits (Alañón et al., 2015) : discrimination des vins selon leur variété (Vaclavik et al., 2011), leur origine géographique (Gougeon et al., 2009; Roullier-Gall et al., 2014), authentification des vins (Cuadros-Inostroza et al., 2010; Roullier-Gall et al., 2017), impact du vieillissement (Castro et al., 2014) et de l'oxydation sur la matrice (Bahut et al., 2019; Romanet et al., 2019; Roullier-Gall et al., 2017). Outre cette application à la matrice œnologique des équipes de recherche se sont attachées à étudier le métabolisme de micro-organismes grâce à cette approche (Mashego et al., 2007; Werf et al., 2007). Ainsi, les levures, acteurs majeurs de la fermentation alcoolique ont fait l'objet d'étude métabolomique (Garcia et al., 2008; Roullier-Gall et al., 2020; Tang, 2011). Les études sont majoritairement focalisées sur les microorganismes individuels (Alves et al., 2015), leur impact sur la matrice et inversement l'impact des conditions environnementales sur leur métabolisme (López-Malo et al., 2013; Rollero et al., 2015). Des études discriminent également l'endométabolome et l'exométabolome associés aux microorganismes impliqués dans les différents processus de fermentation (Richter et al., 2015). Cependant, il reste aujourd'hui difficile d'extraire l'endométabolome (Mashego et al., 2007). En effet, cette extraction de l'endométabolome peut entraîner une dégradation des métabolites lors des différentes étapes d'extraction qu'elles soient chimiques ou mécaniques (Sailwal et al., 2020). C'est pourquoi des travaux se sont intéressés à prédire/modéliser la composition de l'endométabolome à partir de l'exométabolome (Aurich et al., 2015). Selon une autre perspective, très peu d'études se sont attachées à réaliser des analyses métabolomiques d'un consortium de micro-organismes (P.-T. Liu et al., 2016). Cependant, ces dernières années cette approche est davantage utilisée pour comprendre les interactions qui régissent les consortiums microbiens au cours de la vinification comme vu précédemment dans la partie 4.3 (Liu et al., 2016; Petitgonnet et al., 2019; Roullier-Gall et al.,

2020, 2021). Une modification de la composition du vin post fermentation alcoolique (FA) a été observée selon si la FA avait été menée en culture pure ou en co-culture avec *L. thermotolerans*, *S. bacillaris*, *M. pulcherrima*, et *S. cerevisiae*. Cette dernière observation a permis de mettre en évidence que la co-culture conduisait à une modification du métabolisme levurien par le biais d'interactions. Outre la discrimination importante entre les modalités de culture (pure et mixte), les auteurs ont pu distinguer les vins selon l'utilisation des différentes espèces de levures (Roullier-Gall et al., 2020). En 2021, les mêmes auteurs ont pu approfondir cette étude en évaluant l'impact de l'ajout de *S. cerevisiae* sur la composition du métabolome, dans des conditions d'inoculation séquentielle, au cours du temps. Aussi, 24h après l'ajout de *S. cerevisiae*, l'évolution de la composition chimique du milieu est notable, indiquant une dominance de celle-ci sur les autres non-*Saccharomyces* (Roullier-Gall et al., 2021).

Le moût et le vin, matrices complexes, présentent des caractéristiques spécifiques rendant parfois difficile leurs analyses. En effet, ces derniers affichent de grandes concentrations en sucres ou en éthanol. De plus, les composés peuvent se retrouver à très faibles concentration voir à l'état de trace dans la matrice, entravant leur détection et quantification. Différents outils sont aujourd'hui utilisés en œnologie comme la Résonance magnétique nucléaire (RMN), l'électrophorèse capillaire, la spectroscopie de fluorescence ou encore la spectrométrie de masse couplée ou non à des méthodes de séparations chromatographiques. Les techniques utilisées au cours de ces travaux de thèse sont différentes techniques de spectrométrie de masse aussi seule cette dernière sera développée dans cet exposé.

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qualitative et quantitative d'un échantillon qui conduit à la détection et l'identification de métabolites selon leur masse moléculaire. Cette masse est mesurée par rapport à leur charge selon le rapport masse sur charge m/z . Cette mesure du rapport m/z est réalisée différemment selon le type d'analyseurs. Parmi eux on retrouve les analyseurs à faisceaux d'ions comme les quadripôles (Q) et analyseurs à temps de vol (ToF pour Time of Flight), les analyseurs à piégeage d'ions comme les pièges ioniques linéaires ou encore l'Orbitrap® mais également un autre type, l'analyseur par résonance cyclotronique d'ions à transformée de Fourier (FT-ICR). Ces techniques de spectrométrie de masse sont principalement caractérisées par leur pouvoir de résolution de masse, leur sensibilité et leur précision dans la mesure de masse.

En spectrométrie de masse, il est, dans un premier temps, nécessaire d'ioniser (donner une charge positive ou négative) les composés de la matrice et de les transférer de l'état de matière condensée à un état gazeux. L'ionisation a pour conséquence un transfert d'énergie vers les

composés à analyser qui selon leur stabilité se fragmentent plus ou moins. Il existe une grande variété de sources d'ionisation pouvant être classées selon différents paramètres : la taille des molécules à ioniser, la dureté d'ionisation, ou encore la technique utilisée (désorption ou vaporisation). Parmi les plus utilisées on retrouve la photo ionisation à pression Atmosphérique (APPI), l'ionisation chimique à pression Atmosphérique (APCI) et l'électro ionisation (ESI).

L'injection de l'échantillon peut se faire directement dans la source d'ionisation ou peut être précédée d'une séparation des composés par technique séparative telles que les chromatographies phase gazeuse ou phase liquide. Dans le premier cas, lors d'analyses en injection directe, les ions sont insérés en phase par paquets donnant lieu à l'accumulation de spectres. Dans le second cas, les composés sont préalablement séparés selon une caractéristique définie permettant une injection espacée dans le temps pour être détecté ensuite par spectrométrie de masse.

5.2.1. FT-ICR-MS

La spectrométrie de masse à ultra haute résolution (uHRMS) est utilisée pour établir le profil et décrire de manière globale les modifications du métabolome non volatil associées aux conditions métaboliques, en se basant sur la mesure simultanée de plusieurs milliers de signaux grâce à une sensibilité, une résolution et une précision de masse élevées. La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions et à transformée de Fourier en fait partie. Cette approche offre une résolution supérieure à 1000000 et une précision de mesure de masse inférieure à 0.1 ppm. Elle conduit à caractériser les métabolites par une masse exacte et le calcul de formules élémentaires. La FT-ICR-MS est une analyse de masse basée sur la précession des ions dans un champ magnétique homogène. Le rapport masse sur charge m/z peut alors être déterminé selon la fréquence de rotation au sein de ce champ magnétique. En 1974, la transformée de Fourier est combinée pour la première fois permettant, en temps réel, la digitalisation du signal électrique induit par les ions en mouvement dans la cellule ICR (Comisarow et *al.*, 1974) et leur traitement par une opération mathématique pour obtenir le spectre des fréquences cyclotron. La FT-ICR-MS est aujourd'hui régulièrement utilisée pour l'analyse du raisin ou du vin et plus récemment pour l'analyse de phénomènes d'interactions microbiens en vin (Liu et *al.*, 2016; Petitgonnet et *al.*, 2019; Roullier-Gall et *al.*, 2020, 2021).

5.2.2. GCMS

La chromatographie en phase gazeuse (CG) est une technique de séparation des composés volatiles d'une matrice complexe. C'est en 1952 que cette méthode est mise au point

par Martin et Synge (Prix Nobels) rendant possible la séparation de composés gazeux volatilisé par chauffage. Dans cette technique, la phase mobile est un gaz inerte (azote ou hélium) qui induit l'élution des composés selon leur degré d'affinité à la phase solide. Cet outil comprend trois modules spécifiques : un injecteur, une colonne et enfin le détecteur de différentes catégories allant du détecteur à ionisation de flamme (GC-FID), à l'olfactométrie (GC-O) en passant par la spectrométrie de masse (GC-MS). Cette technique est largement utilisée en œnologie pour quantifier les composés volatiles participant au profil aromatique des vins ainsi que l'impact des levures sur celui-ci (Álvarez-Pérez et *al.*, 2012; Callejon et *al.*, 2010; Gammacurta et *al.*, 2014). Cette technique très sensible et robuste permet une très haute résolution chromatographique. En effet, cette dernière donne lieu à l'analyse simultanée de différents groupes de métabolites. Cependant, les métabolites analysés doivent être thermolabiles. De plus, face à des matrices complexes comme le vin, les métabolites doivent être extraits avant injection. Différentes techniques existent désormais et peuvent être classées dans trois catégories selon les propriétés physicochimiques des métabolites, leur volatilité, leur solubilité dans différentes phases organiques, et leur capacité à être absorbés sur un matériau particulier. Aussi, on retrouve l'extraction liquide-liquide (LLE), et extraction en phase solide (SPE) réalisées selon la solubilité des analytes, mais également selon leur volatilité comme la distillation, l'espace de tête (HS), ou la purge and trap et enfin selon l'absorption dont la micro-extraction en phase solide (SPME), l'extraction sorptive sur barreau (SBSE), extraction dynamique en phase solide (SPDE), et micro-extraction en phase solide à couche mince (TF-SPME) (Marín-San Román et *al.*, 2020; Patti et *al.*, 2012). En vin cette technique est majoritairement utilisée pour l'analyse de composés volatiles aromatiques ou pour la détection de composés d'altération. Ces études visent également à comprendre et caractériser l'impact des micro-organismes ainsi que leurs interactions sur la composante volatile comme présenté plus en détails dans la revue (Beckner Whitener et *al.*, 2016; Howell et *al.*, 2006; Martins et *al.*, 2017; Petitgonnet et *al.*, 2019).

5.2.3. LCMS

La chromatographie en phase liquide est quant à elle une technique de séparation qui permet l'identification de composés non volatiles. Elle est basée sur l'affinité de ces composés envers deux phases : une phase mobile (l'éluant) et une phase stationnaire (la colonne). Tout comme la CPG, il existe différents types de détecteurs dont les principaux sont les détecteurs UV, DAD, fluorescence et MS. Cette technique a fait l'objet d'amélioration visant à augmenter les performances de séparation des composés. Ces dernières décennies ont vu se développer la

chromatographie liquide à haute pression puis la chromatographie liquide à ultra-haute pression à travers l'amélioration de la résolution des pics, de la vitesse d'acquisition et de la sensibilité. Cette technique est couramment utilisée en œnologie pour quantifier des composés du vin dont les sucres, les vitamines, les acides organiques ou encore les composés phénoliques (Camarasa *et al.*, 2011; Castellari *et al.*, 2002; Evers *et al.*, 2021; Gobert *et al.*, 2017). Pour les analyses non ciblées, le spectromètre de masse à quadrupole et temps de vol (Q-ToF-MS) est le plus couramment employé. Le couplage à une technique séparative permet une meilleure identification des composés en solution ainsi qu'une meilleure précision dans la quantification de ces derniers que l'injection directe. Cette technique est appliquée aux matrices complexes jus de raisin et vin par différentes équipes (Arapitsas *et al.*, 2016; Capone *et al.*, 2010; Roullier-Gall *et al.*, 2015, 2017, 2020; Theodoridis *et al.*, 2012). Bien que la spectrométrie de masse soit un outil puissant, LC-MS peut s'avérer limitée quant à l'étude de système complexe comme le vin. Aussi, une perte de signal, de sensibilité et de résolution peut être observée. Cette séparation préalable peut, en effet, induire des chevauchements de pics et un décalage des temps de rétention des composés.

5.2.4. Avantages / inconvénients : des techniques complémentaires ?

Ces techniques présentent toutes des avantages et inconvénients (Tableau 6). En effet, ces dernières diffèrent selon leur pouvoir résolutif, leur sensibilité, la précision de masse et les gammes de masses analysées mais également selon les techniques de séparation des composés (Figure 21).

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de spectrométrie de masse

Techniques		Avantages	Inconvénients
Fraction non volatile	FT-ICR-MS	<ul style="list-style-type: none"> - Ultra Haute Résolution - Rapide - Précision de masse - Haute sensibilité - Échantillons complexes 	<ul style="list-style-type: none"> - Différenciation des isomères difficile - Pas de quantification
	LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> - Masses moléculaires importantes - Séparation des isomères - Analyse de composés thermolabiles - Informations structurales - Quantitatif 	<ul style="list-style-type: none"> - Plus long - Quantification de composés présents en concentration importante seulement
Fraction volatile	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> - Haute résolution chromatographique - Faibles masses moléculaires - Informations structurales - Quantitatif 	<ul style="list-style-type: none"> - Analyse de composés non thermolabiles - Dérivatisation des métabolites analysés

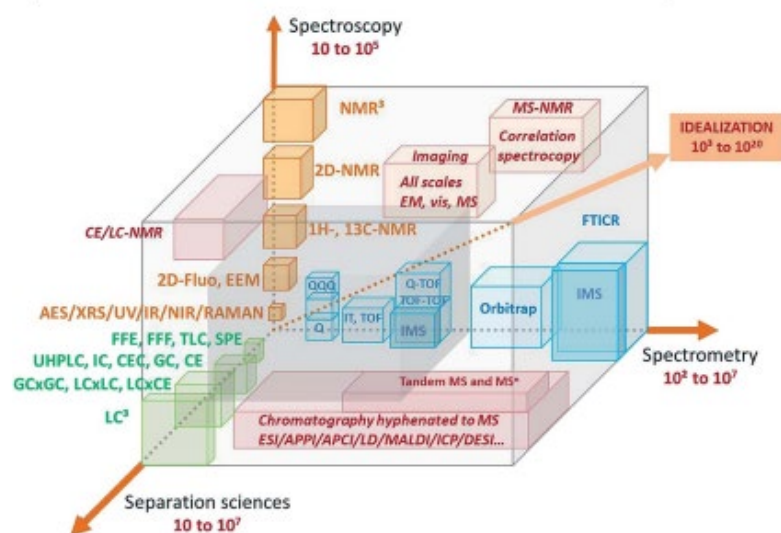


Figure 21 : Représentation schématique de l'espace d'analyse chimique des systèmes impliquant les dimensions de la spectrométrie, de la spectroscopie et des sciences de la séparation avec une résolution croissante. Une résolution ou une orthogonalité supplémentaire est obtenue en spectrométrie de masse avec diverses méthodes d'ionisation, de fragmentation de la masse et/ou de mobilité des ions. Le cube gris au centre couvre les méthodes d'analyse utilisées dans les applications de routine (Schmitt-Kopplin et al., 2019)

Ainsi il est intéressant de pouvoir les combiner pour recueillir un maximum d'informations utiles à l'interprétation biologique des données extraites à la suite de ces analyses.

Il est alors possible d'avoir un panel de composés étudiés plus important en ciblant les fractions volatiles et non volatiles du métabolome. De plus, la corrélation entre les signaux de FT-ICR-MS et ceux obtenus à l'aide d'une résolution plus faible par UPLC q-ToF-MS permet la validation d'annotations de composés, la distinction entre les isomères ainsi que la détermination précise de masses associées aux temps de rétentions. En effet, les techniques couplant la séparation chromatographique à une détection par spectrométrie de masse, confèrent des informations physicochimiques des masses détectées permettant ainsi de valider ou invalider des annotations hypothétiques, tandis que les techniques à injection directe permettent d'augmenter la sensibilité pour les ions présentant une faible abondance

OBJECTIFS

A travers cet exposé bibliographique, une synthèse développant différents thèmes abordés au cours de ces travaux de thèse a pu être établie concernant l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* en œnologie, sa diversité intraspécifique, son métabolisme ainsi que les phénomènes d'interactions microbiennes déjà rencontrés en vin, dans lesquels elle est impliquée, ainsi que les techniques et approches utilisées pour leur étude.

La levure *S. cerevisiae* est un micro-organisme modèle largement étudié dans divers domaines et un des acteurs majeurs de la vinification. Sa capacité d'adaptation au milieu environnant lui confère des avantages indéniables pour persister et devenir l'espèce majoritaire au cours de la fermentation alcoolique. Cette espèce arbore une diversité intraspécifique remarquable qui s'exprime à l'échelle phénotypique également associée à une importante variabilité d'expression de son génome. D'importants systèmes de régulation métabolique et génique sont mis en jeu afin d'ajuster son métabolisme aux conditions environnementales. Les métabolismes azotés et carbonés centraux sont des carrefours métaboliques qui participent à l'ensemble des réactions biologiques à l'origine de l'homéostasie cellulaire, la production de biomasse, d'énergie, mais également à la production de composés organiques d'intérêt comme les composés volatiles. Parmi ces derniers sont retrouvés les alcools supérieurs, les esters ou encore des acides organiques volatiles.

Bien que cette espèce soit décrite comme majoritaire au cours de la fermentation alcoolique, celle-ci évolue en conditions naturelles au sein d'un consortium de micro-organismes comme les levures dont des espèces de non-*Saccharomyces*, des *Saccharomyces non cerevisiae* mais également diverses souches de *S. cerevisiae*. Les interactions intervenant entre levures de différentes espèces sont largement décrites en œnologie, exposant leur impact sur la viabilité cellulaire, sur les performances technologiques de chacune d'elles, ainsi que les mécanismes cellulaires mis en place dans ces phénomènes ou encore leurs conséquences sur le vin. En effet, bon nombre d'études s'accordent à décrire une modulation du profil aromatique des vins issus de cultures mixtes.

Toutefois peu d'études se sont attachées à décrire ces phénomènes entre deux souches d'une même espèce comme *S. cerevisiae*. De plus, les travaux menés présentent des méthodologies distinctes, notamment en termes de matériel biologique, avec l'utilisation d'espèces et souches de levures différentes, de multiples matrices ou encore selon l'application de facteurs abiotiques conduisant à de nombreux résultats spécifiques aux conditions d'étude. Toutes ces variations rendent difficile la génération de conclusions qui décrypteraient les mécanismes impliqués dans ces interactions. Enfin, les approches utilisées se focalisent bien souvent sur l'étude d'impacts

spécifiques sur la matrice ou de mécanismes précis de réponses à ces interactions. Différentes techniques sont aujourd'hui utilisées pour décrire ces phénomènes et définir puis comprendre les mécanismes impliqués dans les interactions, de même que leurs impacts sur la matrice. Ainsi, la combinaison d'approches diverses couvrant un large panel de variables d'études est à prendre en considération.

Ce projet s'inscrit dans la logique d'acquérir de nouvelles connaissances dans la caractérisation de levains mixtes composés de levures d'une seule et même espèce, à savoir *S. cerevisiae*, à travers l'étude des interactions pouvant intervenir entre ces dernières au cours de la fermentation alcoolique. Cette caractérisation vise à décrire l'impact de l'association de deux souches de *S. cerevisiae* sur le profil aromatique et la composition du vin et d'appréhender les mécanismes impliqués.

Cette démarche a été menée selon trois étapes, qui feront chacune l'objet d'un chapitre dans la suite de ce manuscrit (Figures 22 et 23).

En premier lieu, l'objectif était de caractériser douze souches de *S. cerevisiae* commercialisées par la société Lallemand, ainsi que leur impact sur les vins, issus de la fermentation alcoolique d'un moût de Chardonnay, selon une approche intégrative. Cette dernière constitue le « fil rouge » de ce travail de thèse. Elle combine une caractérisation microbiologique et fermentaire, une approche ciblée visant à quantifier les composés volatiles produits par la levure au cours de la fermentation alcoolique. L'impact sur le profil sensoriel des vins issus de ces fermentations, est exploré en parallèle. De même, une approche métabolomique non ciblée permet d'attribuer à chacune des modalités une signature chimique, mettant en lumière les différences dues à l'impact de chacune des souches. Ce premier axe a été valorisé par la publication d'un article scientifique et fait l'objet du Chapitre 1.

Dans un second temps, le but était d'étudier les variations des dynamiques de populations de souches de *S. cerevisiae* en culture pure ou co-culture. Cette approche entreprise par cytométrie en flux, a nécessité l'intégration d'un gène codant pour une protéine fluorescente au sein du génome de l'une des souches en présence afin de les discriminer selon leur intensité de fluorescence. Cette transformation et ses impacts ont fait l'objet d'une étude plus approfondie donnant lieu à la rédaction d'un article scientifique constituant le Chapitre 2.

Le développement de ces deux premiers volets, avait pour ambition finale, la caractérisation des interactions au sein de trois co-cultures comptant chacune deux souches de *S. cerevisiae*. C'est au travers de l'étude des impacts de ces phénomènes sur la composition chimique et les

propriétés sensorielles du vin, selon l'approche intégrative, « fil rouge » de ces travaux que ce cette caractérisation a été développée. Celui-ci constitue le Chapitre 3 rédigé sous la forme d'un article et de résultats complémentaires.

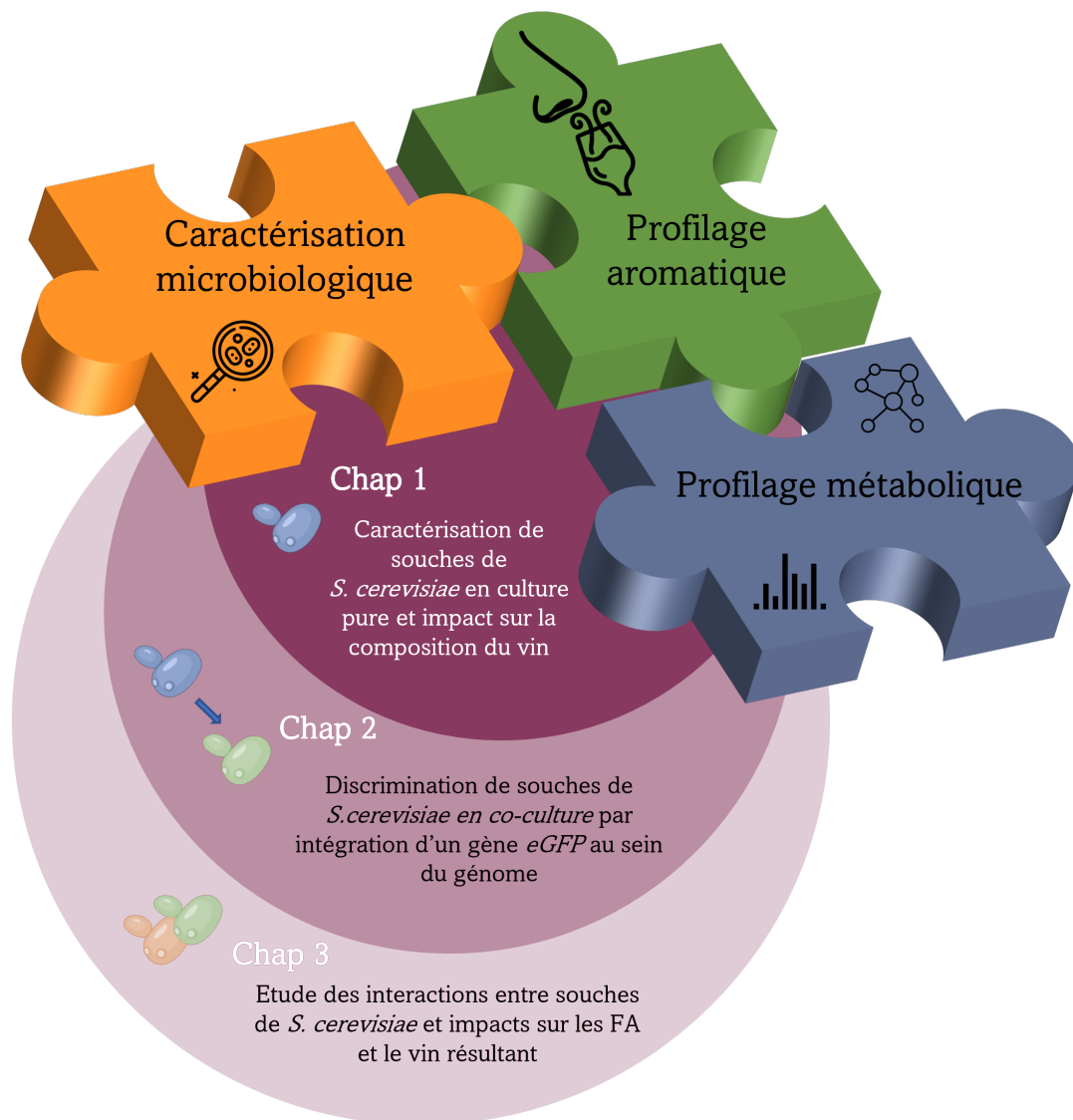


Figure 22 : Représentation schématique des différentes approches utilisées afin de répondre aux différents objectifs des travaux de thèse

MATERIELS ET METHODES

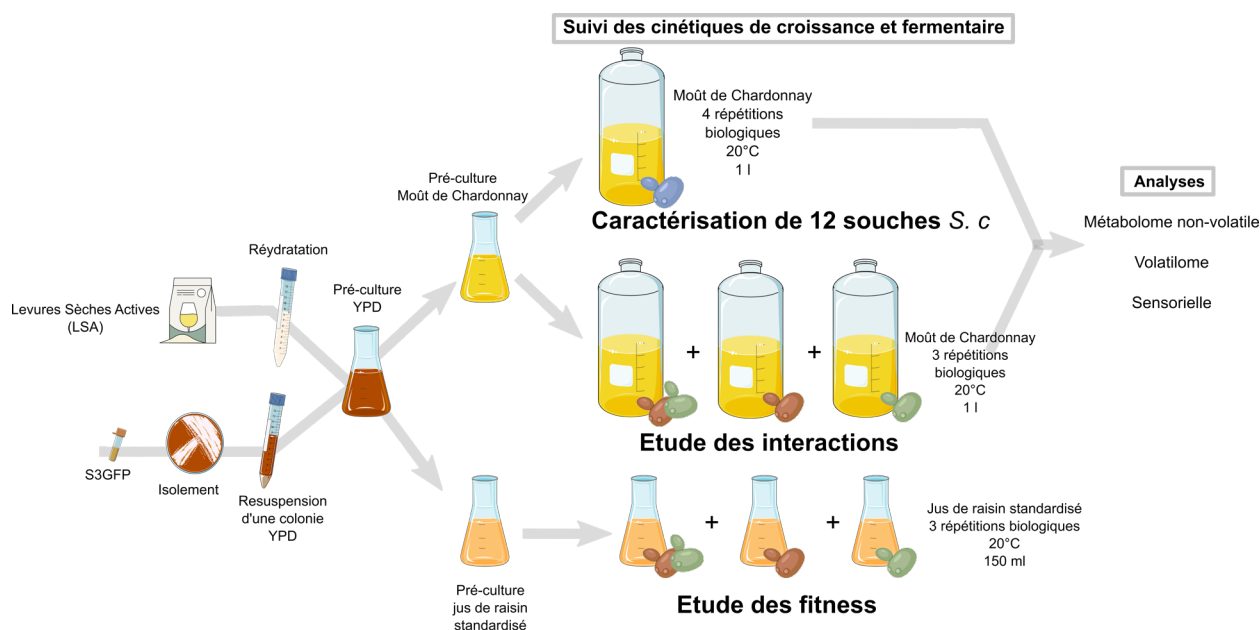


Figure 23 : Plan expérimental développé au cours de la thèse

I. Matériel biologique

1.1. Caractérisation des souches de *Saccharomyces cerevisiae*

Douze souches de *Saccharomyces cerevisiae* commercialisées par la société Lallemand® (Blagnac, France) ont été utilisées au cours de ces travaux. Ces dernières ont été sélectionnées pour leur diversité phénotypique, leurs origines diverses et leurs fonds génétiques. Les souches seront donc codées de S1 à S12 tout au long de ce manuscrit. Ces souches sont conditionnées sous forme de levures sèches actives (LSA) et stockées hermétiquement à 4°C après ouverture.

Afin de pouvoir discriminer les souches entre elles, en cytométrie en flux, dans le cadre de co-cultures il a été nécessaire d'intégrer un gène codant pour une protéine fluorescente. Aussi, la souche S3 a fait l'objet d'une transformation génétique. Cette souche résultant de la transformation sera codée S3GFP tout au long de ce manuscrit.

1.2. Transformation de la souche *S. cerevisiae* S3

La souche S3GFP a été construite à l'aide de l'outil CRISPR-Cas9 dont le mécanisme est résumé Figure 24.

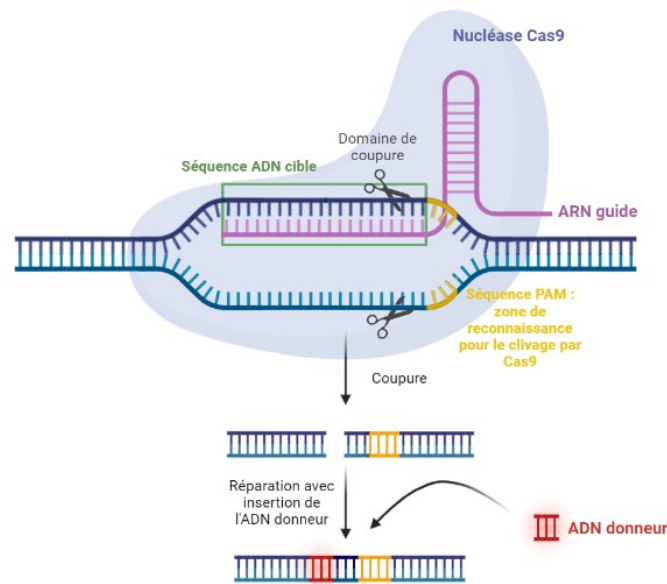


Figure 24 : Schéma du principe de l'outil CRISPR-Cas9 L'ARN guide (sgRNA) dirige l'activité de clivage de Cas9 vers un site génomique spécifique la séquence PAM, où il induit une cassure de l'ADN, permettant l'insertion d'une séquence d'ADN donneur

Deux plasmides vecteurs sont nécessaires pour cette transformation : le plasmide pRCC-K (Generoso et *al.*, 2016) et le plasmide pFA6a-TEF2Pr-GFP-ADH1-NATMX4 (Breslow et *al.*, 2008). Le plasmide pRCC-K est porteur du gène codant pour la protéine Cas9 isolée de la bactérie *Streptococcus pyogenes*, une cassette gRNA (guide RNA) permettant d'insérer un sgRNA (single-guide RNA), et deux gènes de résistance à deux antibiotiques : l'ampicilline (AmpR) et la kanamycine (KanR) (Figure 25) pour la sélection chez l'hôte intermédiaire, *Escherichia coli*. La souche de *Escherichia coli* DH5- α (New England Biolabs) est, en effet, utilisée comme hôte intermédiaire pour la construction des vecteurs contenant les différents éléments du système CRISPR-Cas9. Elle est cultivée en milieu Luria-Bertani (LB) (10g.l⁻¹ tryptone, 5 g.l⁻¹ extrait de levure, 10 g.l⁻¹ chlorure de sodium, pH 7) à 37°C sous agitation (rotation 120 rpm pour les cultures liquides).

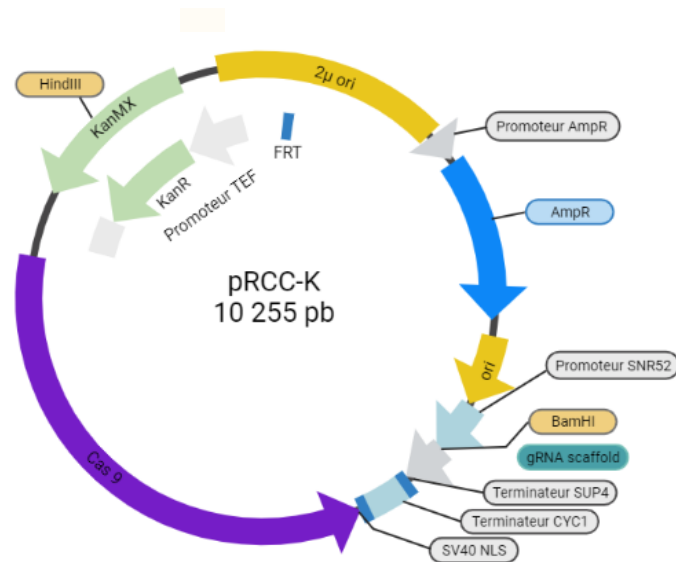


Figure 25 : Plasmide pRCC-K (Generoso et al. 2016)

Le plasmide pFA6a-TEF2Pr-GFP-ADH1-NATMX4 quant à lui constitue le support de l'ADN donneur comprenant le gène codant pour la protéine eGFP et la cassette de résistance à la nourséothricine (*NatMX6*) permettant la sélection des transformants de *S. cerevisiae* (Figure 26).

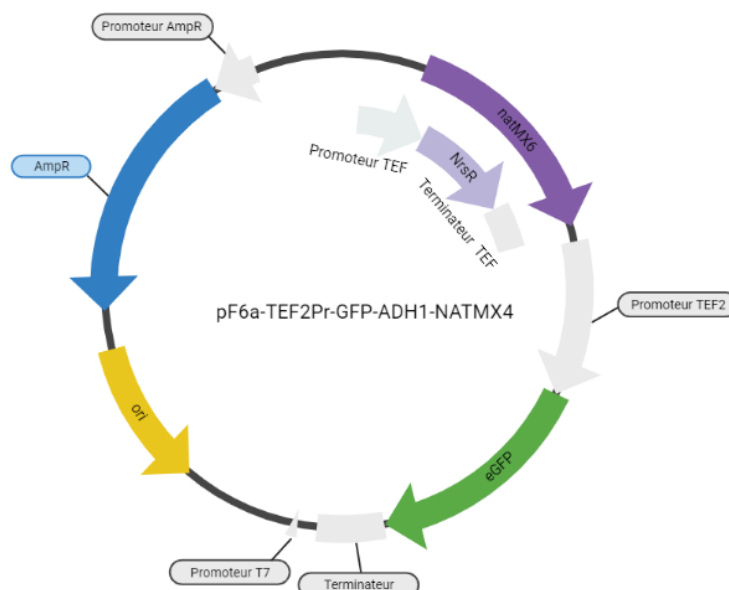


Figure 26 : Plasmide pFA6a-TEF2Pr-GFP-ADH1-NATMX4 (Breslow et al. 2008)

Le sgRNA a été conçu pour cibler le gène *HO* qui une fois inactivé est connu pour ne pas altérer les performances fermentaires et les capacités de croissance des souches de *S. cerevisiae* diploïdes (Herskowitz, I., 1981; Kostriken et al., 1983; Russell et al., 1986). Celui-ci a été designé en utilisant gRNA designer (ATUM) (Tableau 1). Une fois conçu ce gRNA-oligotarget1-*HO* est intégré au plasmide pRCC-K en aval du promoteur SNR52. Le plasmide est dans un premier temps linéarisé par digestion enzymatique par BamHI puis l'assemblage

est réalisé grâce au kit de « NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning » (New England Biolabs) conformément aux recommandations du fabricant. Le plasmide résultant de cet assemblage est nommé pCE. Ce dernier a ensuite été transféré dans l'hôte intermédiaire *E. coli* DH5 α . Les colonies recombinantes ont alors été sélectionnées sur milieu de culture gélosé LB supplémenté en ampicilline (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Ainsi, une vérification de l'insertion du sgRNA dans pRCC-K a pu être réalisée par extraction d'ADN plasmidique à l'aide de NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) suivi d'un séquençage Sanger par la société Genewiz® en utilisant l'amorce V1-AS-F (Tableau 1).

En parallèle, le fragment d'ADN donneur contenant le gène *GFP* et la cassette de résistance à la nourséothricine a été amplifié à partir du plasmide pFA6a-TEF2Pr-eGFP-ADH1-NATMX4 (Breslow *et al.*, 2008) en utilisant des amorces (Fluo-F-*HO* et Fluo-R-*HO*, Tableau 1) et la Taq polymérase (ROCHE) selon les instructions du fabricant. Les deux amorces contenaient des queues flottantes en 5' correspondant à la séquence du gène *HO* permettant la recombinaison homologue au sein du génome de *S. cerevisiae*.

Afin de pouvoir transformer les levures, il a été nécessaire de les rendre compétentes à recevoir la transformation. Un traitement chimique à l'acétate de lithium LiAc a été utilisé pour cette étape. Les cellules *S. cerevisiae* ont été cultivées dans un milieu YPD à 28°C sous agitation jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm (OD600) soit de 2. Les cellules (100 UDO) ont été récoltées par centrifugation (1700 \times g pendant 5 min à température ambiante (RT)) et lavées dans 10 mM Tris pH 7.5. Les levures ont été ensuite centrifugées à 1700 \times g pendant 5 min à température ambiante et remises en suspension dans le tampon LiAc (acétate de lithium 0,1 M, Tris 10 mM, pH 7,5) avant d'être incubées pendant 40 min à 20°C. Les cellules de levure compétentes ont été centrifugées à 1700 \times g pendant 5 min à température ambiante et pour être par la suite remises en suspension dans 2,25 ml de tampon LiAc.

A 100 μl de ces cellules compétentes, ont été ajoutés, le plasmide pCE (500 ng), le fragment GFP-Nourséothricine (1 μg) et de l'ADN de sperme de saumon (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, Sigma) et incubés 10 min à 20°C sans agitation. Ensuite, 300 μl de 50% PEG 4000 ont été ajoutés avant d'être incubés 10 min supplémentaires à 20°C. Les cellules de levure ont ensuite été soumises à un choc thermique à 42°C pendant 15 min. Le PEG a été éliminé par centrifugation (1700 \times g pendant 4 min) et les cellules transformées ont été remises en suspension dans 500 μl de YPD et incubées à 30°C pendant la nuit en agitant doucement. Les souches recombinantes de *S. cerevisiae* ont été sélectionnées sur milieu gélosé YPD supplémenté avec de la nourséothricine (75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Sigma).

Enfin, la recombinaison homologue a été vérifiée par amplification PCR sur les colonies recombinantes de levures. L'ADN chromosomique a été extrait des colonies de levures à l'aide du kit InstaGene™ Matrix (Bio Rad) puis amplifié grâce à l'ADN polymérase GoTaq® (Promega) selon les instructions du fabricant. Le fragment GFP-Nourseothricine a été amplifié en parallèle à l'aide des amorces VerifGFP-F et VerifGFP-R (Tableau 7) tandis que la recombinaison dans le gène HO a été vérifiée à l'aide des deux couples d'amorces V1HO-F V2HO-R et V2HO-F V1HO-R.

Tableau 7 : Amorces utilisées pour la transformation de la souche de S. cerevisiae et la vérification de transformation. La séquence de l'ARNg ciblant le gène HO a été soulignée pour l'ARNg-oligotarget1-HO. Les queues flottantes des amorces Fluo-F-HO et Fluo-R-HO permettant la recombinaison ont également été soulignées.

Amorces	Séquences
gRNA-oligotarget1- HO	5'-CTCCGCAGTGAAAGATAAATGATCA <u>AAATTGGGCATTACGCCCGA</u> GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAAGG-3'
V1-AS-F	GTAGTGCCCTCTTGGGCTA
Fluo-F-HO	5'- <u>AAAAAGGCCAAAAGACAAAGGCCAAAAATTGGGCATTACGCCGGTCGACGGATCCCCGGGTT</u> -3'
Fluo-R-HO	5'- <u>CACATTTTATACACTCTGGTCCTTAACTGGCAAACCTTCGTCGATGAATTCGAGCTCGTT</u> -3'
VerifGFP-F	5'-ACGGCGTCGTACAAGAGAAC-3'
VerifGFP-R	5'-TACATAACCTTCGGGCATGG-3'
V1HO-F	5'-CATACGACTGTAATGTTGCT-3'
V2HO-R	5'-AAACTGTAAGATTCCGCCAC-3'

1.3. Moût de Chardonnay

Les fermentations ont été réalisées en moût de Chardonnay (millésime 2018) flash pasteurisé dont 2 hl ont été fournis par le domaine expérimental de Pech Rouge, Gruissan et conservé à -20°C dont les caractéristiques sont recensées Tableau 8.

Tableau 8 : Paramètres physico-chimiques du moût de Chardonnay 2018

Paramètres physico-chimiques	Chardonnay 2018
Sucres (g.l ⁻¹)	226,6
Taux alcoométrique potentiel (%vol)	13,4
pH	3,92
Azote aminé (mg N.l ⁻¹)	219
Azote ammoniacal (mg N.l ⁻¹)	124,1
Acide malique (g.l ⁻¹)	2,9
Acide tartrique (g.l ⁻¹)	2,8
Acide glucuronique (g.l ⁻¹)	0,05
Densité	1,095
Acidité totale (g.l ⁻¹)	2,11
Acidité volatile (g.l ⁻¹)	0,12

1.4. Jus de raisin standardisé

Le jus de raisin blanc commercial (Raisin blanc et muscat, Groupe Casino) a été utilisé pour l'étude fitness des levures (Partie 5.1). Afin de se rapprocher des conditions du moût de Chardonnay réel utilisé en parallèle, celui-ci a été standardisé (jus de raisin standardisé). Composé naturellement de 160 g.l⁻¹ de sucres fermentescibles, ce jus a été supplémenté pour atteindre une concentration totale en sucre à 220 g.l⁻¹ (jus de raisin standardisé) avec un ratio 50/50 (m/m) de glucose et fructose. La concentration en azote assimilable étant d'environ 160 mg.l⁻¹, cette dernière a également été ajustée afin d'éviter une éventuelle carence à hauteur de 200 mg.l⁻¹ avec du diammonium hydrogenophosphate ((NH₄)₂HPO₄, Merck, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis). Avant inoculation, le jus a été stérilisé par filtration sur filtre à membrane de cellulose avec des pores de 0,22 µm (Steritop-GP, MERCK-Millipore, Burlington, Massachusetts, États-Unis).

II. Conditions de fermentations

2.1. Conditions de pré-cultures

Chaque souche a été réhydratée à partir du stock LSA selon les préconisations de la société Lallemand puis diluée à une concentration de 0,1 % (v/v) dans 150 ml de milieu YPD (extrait de levure à 0,5 % (p/v), bactopeptone à 1 % (p/v), glucose à 2 % (p/v) et chloramphénicol à 0,02 % (p/v)) dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml. Après incubation à 28 °C sous agitation (150 rpm) pendant 18 h, une deuxième culture, a été réalisée dans 150 ml de moût de Chardonnay filtré sur une membrane de 0,22 µm (Steritop-GP, MERCK-Millipore, Burlington, Massachusetts, États-Unis) ou jus de raisin standardisé (selon l'étude), dans des flacons Erlenmeyer (250 ml) à 28°C en mode statique pendant 18 h. Ces dernières cultures ont été utilisées pour inoculer du moût de Chardonnay ou le jus raisin.

2.2. Fermentations en Moût de Chardonnay

2.2.1. Caractérisation de douze souches de *S. cerevisiae* (Figure 27)

Chacune des douze souches a été inoculée à une concentration de 1×10⁶ cellules viables.ml⁻¹. Ces fermentations ont été conduites dans des bouteilles de 2 l contenant 1 l de moût de Chardonnay et recouvertes de coton cardé stérile. Pour chaque souche, les essais ont été réalisés en quatre répétitions biologiques à 20°C sans agitation. La fin de la fermentation a été considérée comme l'épuisement total des sucres.

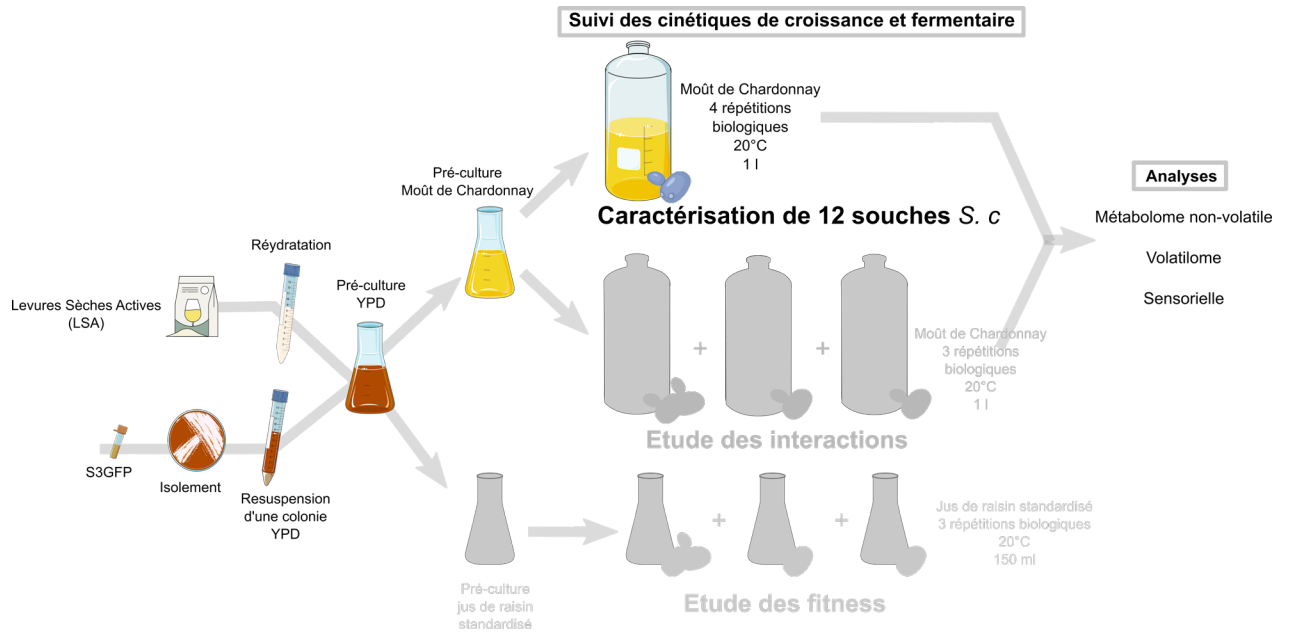


Figure 27 : Focus sur la caractérisation de douze souches de *S. cerevisiae*

2.2.2. Etude des interactions *S. cerevisiae* / *S. cerevisiae* (Figure 28)

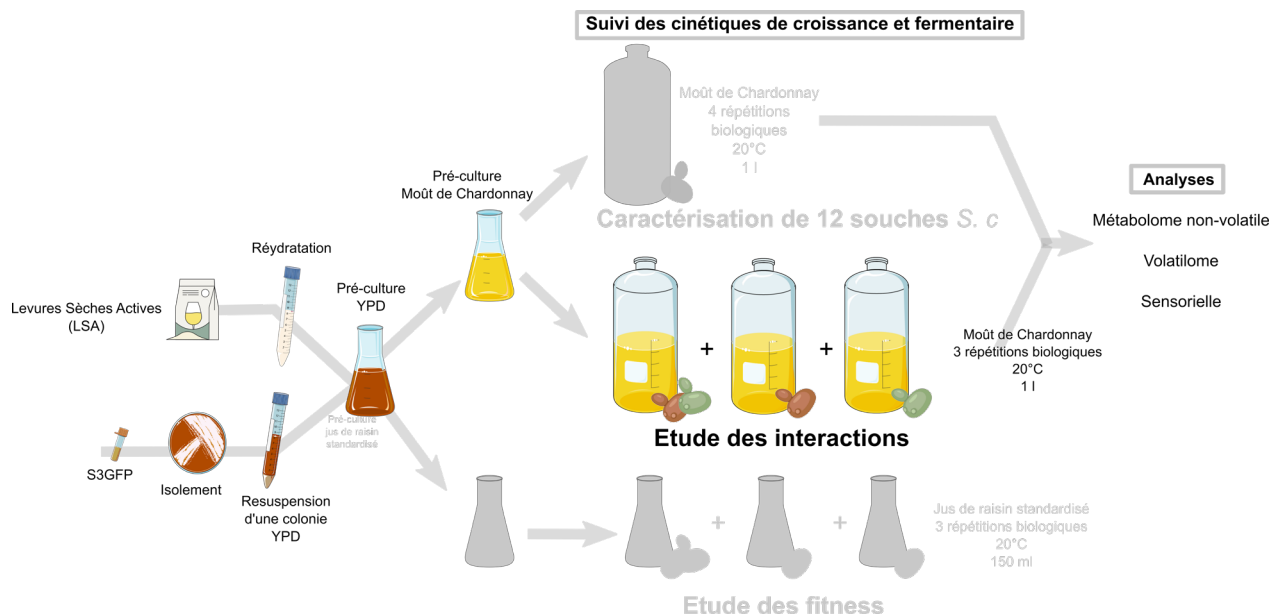


Figure 28 : Focus sur l'étude des interactions *S. cerevisiae* / *S. cerevisiae*

Parmi les douze souches caractérisées au cours du développement de l'axe 1 de la thèse, 4 souches (S2, S3, S4 et S8) ont été sélectionnées pour l'étude des interactions dans le cadre de co-inoculations. Ces dernières ont été choisies pour leur diversité métabolique et leurs différents impacts sensoriels sur le produit fini. Trois couples ont été formés comprenant une souche commune, la souche S3. Au cours de cette étude, trois modalités, S2S3, S4S3 et S8S3, ont été étudiées comprenant chacune l'étude des fermentations en cultures pures, la fermentation en

co-inoculation avec la souche sauvage S3 et la fermentation en co-inoculation avec la souche transformée S3GFP. L'ensemble de ces fermentations ont été conduites en bouteilles de 2 l contenant 1 l de moût de Chardonnay recouvertes de coton cardé stérile. Chacune des fermentations a été menée en trois réplicas biologiques. Pour chacune des fermentations, la concentration de l'inoculum était de 1×10^6 cellules viables.ml⁻¹. Cependant, les cultures pures comprenaient une seule souche tandis que les co-cultures comprenaient chacune deux souches avec un ratio de 50/50 (Tableau 9). Ainsi, les souches en co-cultures étaient inoculées à 5×10^5 cellules viables.ml⁻¹.

Tableau 9 : Description de la composition levurienne initiale des fermentations menées. La proportion de chacune des souches de *S. cerevisiae* est indiquée pour chaque condition étudiée. Chaque couleur symbolise une modalité : S2S3 (Orange), S4S3 (Bleu), S8S3 (Vert).

	Conditions (% de chaque souche dans chacune des conditions)											
	S3	S3GFP	S2	S4	S8	S2 / S3	S2 / S3GFP	S4 / S3	S4 / S3GFP	S8 / S3	S8 / S3GFP	
Souches de <i>S. cerevisiae</i>	S3	100	-	-	-	-	50	-	50	-	50	-
	S3GFP	-	100	-	-	-	-	50	-	50	-	50
	S2	-	-	100	-	-	50	50	-	-	-	-
	S4	-	-	-	100	-	-	-	50	50	-	-
	S8	-	-	-	-	100	-	-	-	-	50	50

2.3. Etude de paramètres de croissance, fermentaire et avantage de fitness de souches de *S. cerevisiae* en culture pure et co-culture (Figure 29)

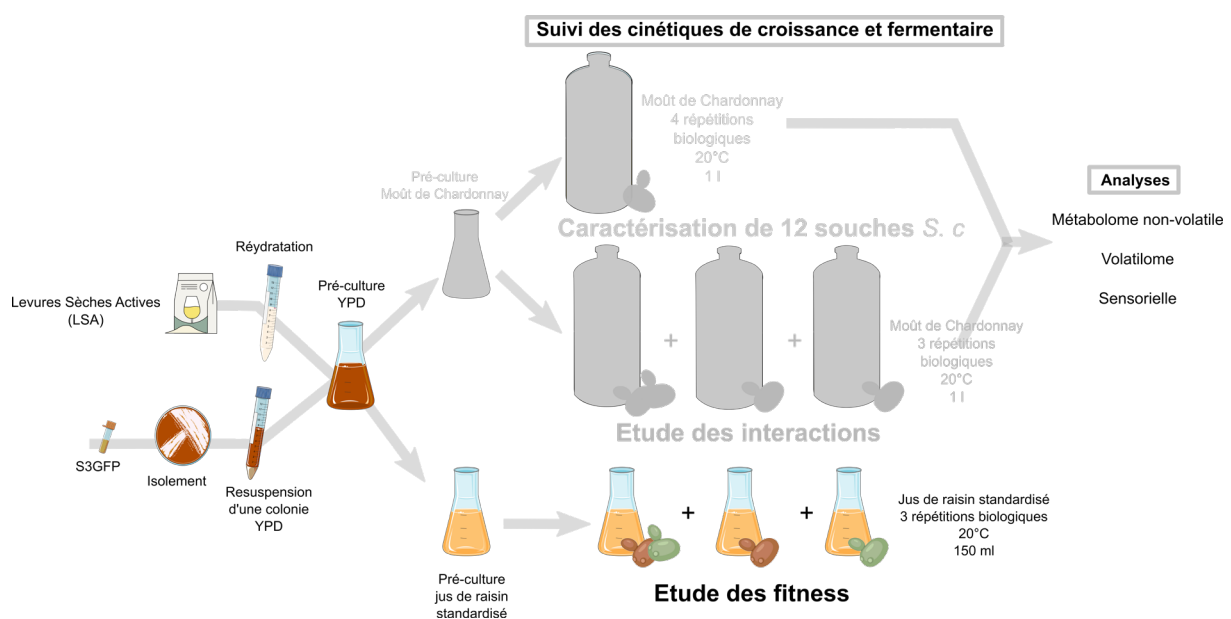


Figure 29 : Focus sur l'étude de l'adaptation de *S. cerevisiae* dans le cadre d'interactions en jus standardisé

Une étude préliminaire à l'étude des interactions en moût de Chardonnay, a été menée en jus de raisin standardisé pour déterminer l'impact de l'association de deux souches de *S. cerevisiae* sur leur dynamique de population respective et les performances fermentaires de par l'extraction de paramètres décrits Partie 3.3. En outre, l'avantage de fitness d'une souche sur l'autre co-cultures a été déterminé Partie 3.3. Les modalités étudiées sont identiques à la section précédente (Tableau 9). Ces fermentations ont été menées en flacons Erlenmeyer de 250 ml contenant 150 ml de jus de raisin standardisé recouvertes de coton cardé stérile. Ce suivi a été réalisé par prélèvement toutes les trois heures pendant trois jours puis une fois par jour jusqu'à dégradation complète des sucres. Chacune des fermentations a également été menée en trois réplicatas biologiques.

III. Suivi des fermentations

3.1. Suivi des cinétiques de croissance par cytométrie en flux

La vitalité cellulaire en préculture et au cours de la fermentation a été déterminée par cytométrie en flux. Ces analyses ont été réalisées à l'aide d'un cytomètre en flux BD Accuri C6. Les données résultantes ont été traitées à l'aide du logiciel associé « BD Accuri C6 Software ». Pour chaque échantillon, 20 μl ont été analysés à un débit de 34 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Le seuil de détection FSH utilisé était de 80 000. Un laser à argon de longueur d'onde de 488 nm a été utilisé pour exciter les cellules marquées (avec une sonde ou un fluorochrome) ou non (autofluorescence). Deux filtres ont été utilisés pour détecter la fluorescence émise par les cellules : le filtre FL1-H (530 \pm 30 nm) pour la fluorescence verte et le filtre « long-pass » FL3-H (675 nm) pour la fluorescence émise dans le rouge. Deux fluorochromes ont été utilisés au cours de ces travaux afin d'évaluer la vitalité cellulaire.

Le 5-6 carboxyfluorescein diacetate (cFDA) (Invitrogen, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, Illkrich, France) est un marqueur non fluorescent qui intègre la cellule par diffusion passive pour y être clivé par les estérases cellulaires. Ce clivage induit la libération de molécules fluorescentes dans le vert : la carboxy-fluorescéine renseigne sur l'activité métabolique cellulaire et donc la viabilité. Le cFDA est dissous dans de l'acétone à une concentration de 1500 μM (Longin et *al.*, 2017). Trois μl de celui-ci ont été ajoutés à 100 μl de suspension cellulaire diluée dans un tampon Mc Ilvain (acide citrique 100 mM, Na_2HPO_4 200 mM, pH 4). Les échantillons ont été incubés dans l'obscurité 20 min avant la mesure. La fluorescence du cFDA a été mesurée sur le filtre FL1-H (533/530 nm), et les données de lumière diffusée

latéralement (SSC-H) et axialement (FSC-H) ont été analysées et affichées selon une échelle logarithmique.

L'Iodure de propidium (IP) est un agent intercalant fluorescent des acides nucléiques qui pénètre la cellule uniquement si la membrane plasmique est altérée. Une fois intégré dans la cellule celui-ci se fixe à l'ADN avec pour conséquence l'émission d'une fluorescence rouge. Ce dernier permet la détection de cellules présentant une altération de la membrane plasmique, une des caractéristiques de la mort cellulaire. L'IP est dissous (Invitrogen, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) dans de l'eau à une concentration de $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$. $1 \mu\text{l}$ d'IP ont été ajoutés à $100 \mu\text{l}$ de suspension cellulaire diluée dans un tampon PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, et 11.9 mM Phosphate, pH 7,2) (Fisher Scientific, Illkirch, France). Les échantillons ont ensuite été incubés dans l'obscurité pendant 15 min avant d'être analysés.

Aussi, cette technique a permis de discriminer les souches de *S. cerevisiae* au sein des co-cultures grâce à l'intégration du gène codant pour la protéine eGFP dans le génome de S3. Une discrimination en fonction de l'intensité de fluorescence verte est alors possible sur le filtre FL1-H (Figure 30).

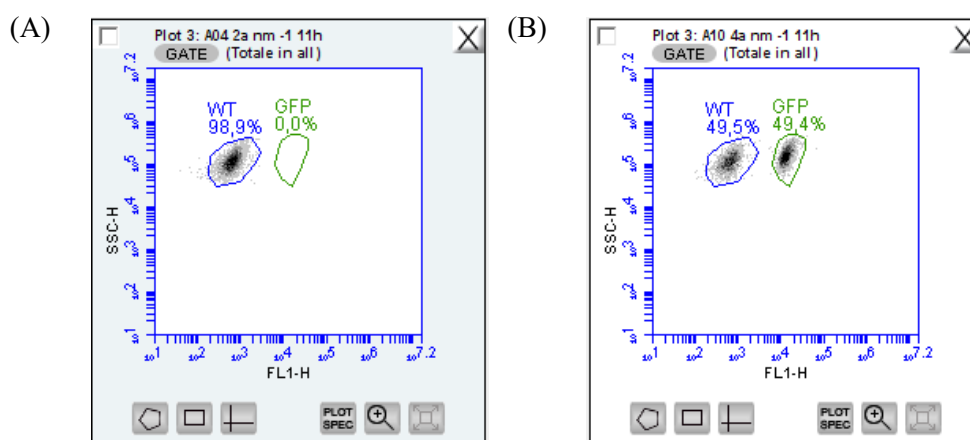


Figure 30 : Exemples de cytogrammes SSC-H vs FL1-H des conditions co-cultures S8S3 comprenant la souche sauvage (A) ou la souche transformée (B)

3.2. Suivi des cinétiques fermentaires par Spectroscopie Infra-Rouge

Différents paramètres œnologiques ont été suivis au cours de la fermentation par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FT-IR) (OenoFOSS™, FOSS, Hilleroed, Denmark). Cette technique réside dans la spectroscopie infra-rouge couplée à la transformée de Fourier. $200 \mu\text{l}$ de moût, de moût en fermentation ou de vin ont été centrifugés avant que le surnageant soit analysé. Cette analyse a été réalisée, tout au long de la fermentation jusqu'à

épuisement des sucres, une à plusieurs fois par jour selon l'étude. La concentration en sucres (glucose et fructose), le pourcentage d'éthanol, et le pH ont permis d'évaluer la composition physico-chimique des échantillons.

3.3. Paramètres étudiés

Une cinétique de croissance des souches de *S. cerevisiae* pour chacune des conditions a pu être établie selon la représentation [cellules viables] = f(temps). De plus, différents paramètres de croissance permettant l'étude de fitness des souches en culture pure et co-cultures ont pu être déterminés graphiquement. Parmi eux, on retrouve la vitesse maximale de croissance (μ_{max}), la population maximale viable (K) et le nombre de génération pour atteindre cette population maximale qui est décrit selon l'équation 2 où N correspond à la population maximale viable et N_0 la population viable initiale.

$$NG = \log\left(\frac{N}{N_0}\right)$$

Équation 2 : Equation pour déterminer le nombre de génération pour atteindre la population maximale

L'avantage de fitness (m) entre deux microorganismes peut être défini, comme développé par (García-Ríos et al., 2014), par l'expression suivante : $m = r_1 - r_2$, où m correspond à la différence μ_{max} de deux souches (r_1 et r_2) dans des conditions environnementales spécifiques. Dans cette étude, nous avons généré la valeur m avec la comparaison des deux souches au sein de la co-culture.

En parallèle, une cinétique fermentaire a également pu être établie selon la représentation [sucres]=f(temps) permettant d'extraire différents paramètres clés dans l'étude de fitness cellulaire comme la Vitesse maximale de dégradation des sucres (V_{max}) ou encore le temps pour dégrader 50% des sucres fermentescibles initiaux (T50).

Les données qui ne sont pas issues de ces analyses ont été explicitées comme des moyennes de triplicata \pm écart type. Une analyse statistique a été menée en utilisant un test de Student ou t-test pour déterminer s'il existe une différence significative (p-value < 0,05) entre les conditions deux à deux. Une ANOVA a également été réalisée sur les données par modalité, suivie du test Tukey HSD utilisé post-hoc pour définir les différences entre les conditions deux à deux.

IV. Microscopie bi-photon

La microscopie à imagerie à deux photons a été réalisée pour obtenir des représentations en 2D des deux souches de *S. cerevisiae*. Les images ont été recueillies sur un microscope à balayage Nikon A1-MP équipé d'un objectif Plan APO IR $\times 60$ (NA, 1,27 ; Water Immersion, Nikon) à une vitesse de balayage d'une image par seconde. Un laser IR (Chameleon, Coherent) a été utilisé pour fournir une excitation à 820 nm. L'émission de fluorescence a été collectée sur deux canaux de détection : FF01-492/SP (400-492 nm) et FF03-525/50 (500-550 nm) (Semrock). Les images fournies dans l'article ont été obtenues en fusionnant ces deux canaux de détection.

Des échantillons de culture ont été prélevés en fin de phase exponentielle en moût de Chardonnay et centrifugés à $8\,000 \times g$ pendant 5 min à 20°C. Le surnageant de culture a été retiré et le culot remis en suspension dans un tampon PBS (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, et 11,9 mM Phosphate, pH 7,2) (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France). Cinq microlitres de suspension cellulaire ont été placés entre une lame de verre et une lamelle couvre-objet pour l'observation.

V. Analyse des vins

5.1. Analyse métabolomique

La démarche opérationnelle en métabolomique repose sur une succession d'étapes qui sont similaires quelles que soient les techniques utilisées. Ce cheminement ou « Workflow » concerne l'ensemble des étapes de la collecte des échantillons à l'interprétation biologique des données, en passant par leur acquisition et l'analyse bio-informatique (Figure 31).

La métabolomique génère un grand nombre de données pouvant rendre le traitement de celles-ci laborieux. Aussi, l'utilisation d'analyses statistiques multivariées est requise. Ces dernières permettent une visualisation des données dans leur globalité, une réduction du jeu de données brutes ayant un sens biologique ainsi qu'une caractérisation des métabolites présentant un intérêt pour décrire le phénomène biologique étudié. Les techniques d'exploration de données et les statistiques associées, sont issues du champ de la chimiométrie.

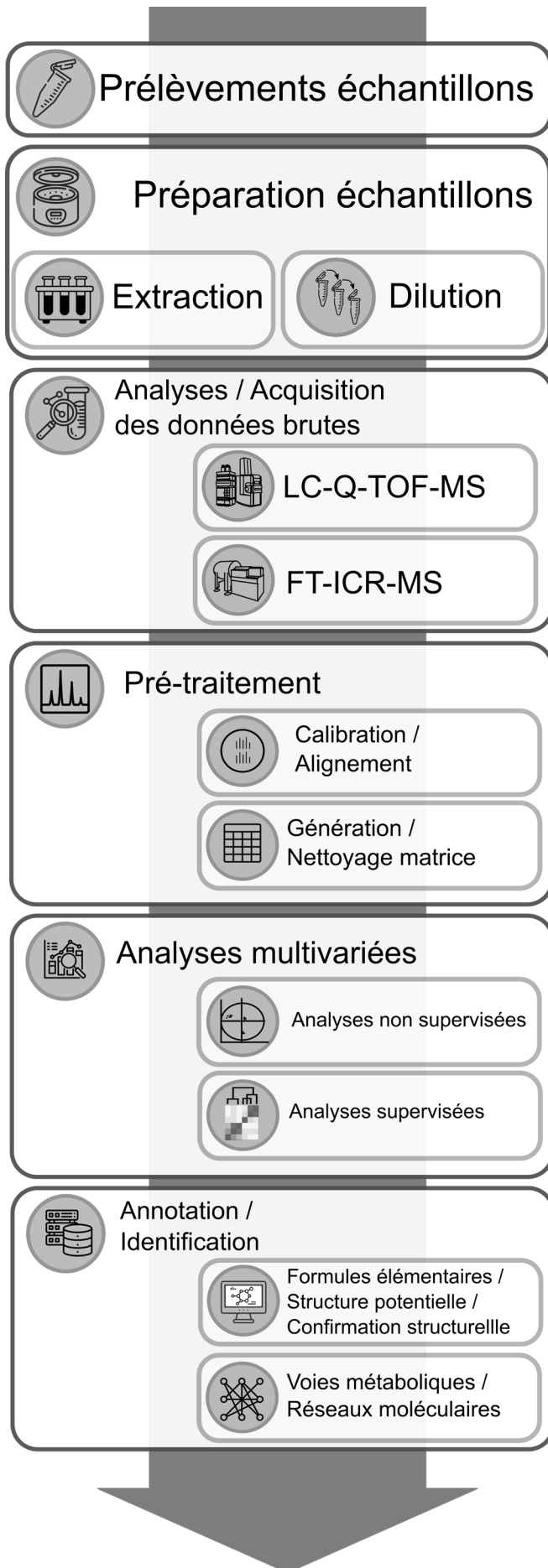


Figure 31 : Workflow de l'analyse métabolomique non ciblée

Divers outils statistiques sont la plupart du temps utilisés suivant une démarche, dirigée par les questions biologiques émises en amont de l'expérimentation. Cette démarche peut être réalisée sous divers angles d'étude selon la question expérimentale posée, d'une part, la nature de l'analyse, qualitative ou quantitative, et d'autre part selon l'échelle d'étude, inter- et intra-échantillons (Figure 32). Celle-ci conduit à révéler des composés que l'on nommera biomarqueurs. Parmi ces derniers sont retrouvés les biomarqueurs (i) uniques soit présents uniquement dans un échantillon parmi le groupe d'étude ou (ii) présents dans plusieurs échantillons mais dont l'intensité est significativement différente selon les échantillons.

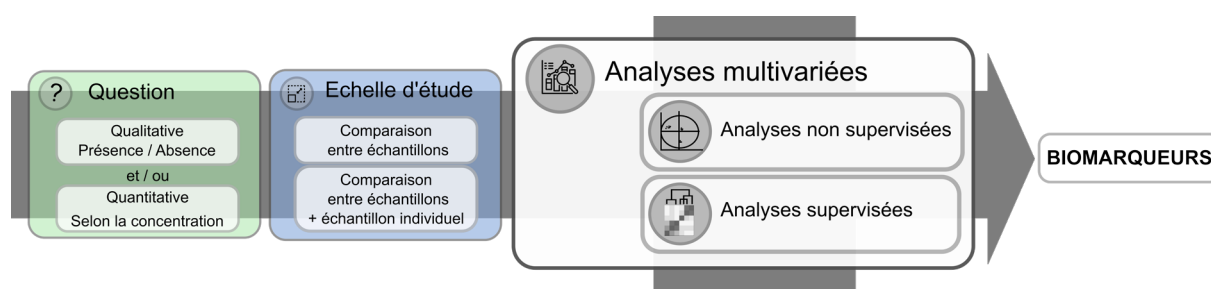


Figure 32 : Démarche pour extraire les biomarqueurs

Les outils peuvent être décrits selon deux catégories : les analyses descriptives qui sont dites exploratoires et correspondent aux méthodes non supervisées comme l'Analyse en Composante Principale (ACP) ou la Classification Ascendante Hiérarchique et les analyses explicatives dites supervisées. Ces dernières visent à répondre à une question biologique prédéterminée. Parmi elles, on retrouve l'analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels (PLS) ou l'analyse discriminante par régression partielle (PLS-DA).

5.1.1. Spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique et à transformer de Fourier (FT-ICR-MS)

Les vins post fermentations alcooliques ont été analysés par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution, la FT-ICR-MS. L'instrument FT-ICR-MS utilisée pour ces travaux (Solarix, Bruker Daltonik, Bremen, Allemagne) est équipé d'un aimant supraconducteur de 12 Tesla (Magnex Scientific Inc., Yarnton, GB) et d'une source d'ionisation par électrospray Apollo II (Bruker Daltonik, Bremen, Allemagne) en mode d'ionisation négatif (Figure 33).



Figure 33 : Spectromètre de masse FT-ICR-MS Solaris (Bruker)

Avant analyse, une calibration externe de l'appareil est réalisée avec une solution méthanolique de clusters d'arginine (10 mg.l^{-1}) et donnent une précision de masse quotidienne inférieure à 0,1 ppm. Tous les échantillons ont été injectés de manière aléatoire dans le même lot. Les échantillons ont été recueillis à la fin de la fermentation alcoolique et dilués à 5 :100 (v/v) dans du méthanol (qualité LC-MS, Fluka, Allemagne) pour être injectés à un débit de $120 \mu\text{l.h}^{-1}$ à l'aide d'un auto-sampler. De plus, des contrôles qualité (QC) correspondant à un pool d'une fraction de l'ensemble des échantillons analysés sont injectés en début de run et tous les 10 échantillons afin de vérifier la reproductibilité des mesures au cours de l'analyse. Pour chaque spectre, 300 scans ont été accumulés dans la gamme de masse de m/z 147-2000 dans un domaine temporel de 4 MW (MegaWords). Un pouvoir résolutif de 400 000 à 300 m/z a été obtenu. Cette technique permet dans des systèmes complexes comme le vin la discrimination de signaux avec un rapport m/z extrêmement proche. Cette résolution est définie par l'équation $R = \frac{m/z}{\Delta m/z}$ avec m/z (rapport masse sur charge expérimental) et $\Delta m/z$ (largeur du pic à 50% de la hauteur totale du pic). Cette résolution est d'autant plus grande que les masses sont faibles. Les spectres bruts ont été analysés à l'aide du logiciel DataAnalysis (v. 4.3, Bruker Daltonik GmbH, Mannheim, Allemagne) et soumis à une calibration interne à partir d'une liste constituée de composés récurrents du vin (Annexe 2) afin de ne conserver que les pics m/z ayant un rapport signal/bruit (S/N) égal ou supérieur à 4, présentant une intensité relative minimale de 100, avec une tolérance de 0,2 ppm. Le logiciel Matrix Generator (v. 0.4,

Helmholtz-Zentrum, Munich, Allemagne) a ensuite été utilisé pour aligner chaque pic avec une fenêtre de précision de masse de maximum 1 ppm.

La qualité de l'analyse a été contrôlée avant tout traitement de données. Pour chaque analyse, une analyse en composante principale est réalisée sur l'ensemble du jeu de données afin de valider sur une représentation graphique la répétabilité des répliques biologiques et QC. Ceci est complété par la représentation de la première composante principale ($t(1)$) en fonction de l'ordre d'exécution des échantillons dans le temps. Aussi, le coefficient de variation (CV) des intensités de masses détectées parmi les contrôles qualité est déterminé et représenté sous forme d'histogramme (Figure 34A). Une analyse de la stabilité des intensités maximale, moyenne et minimale des pics pour chacun des QC au cours de l'analyse est opérée. Enfin, une vérification de la calibration des spectres est réalisée (Figure 34).

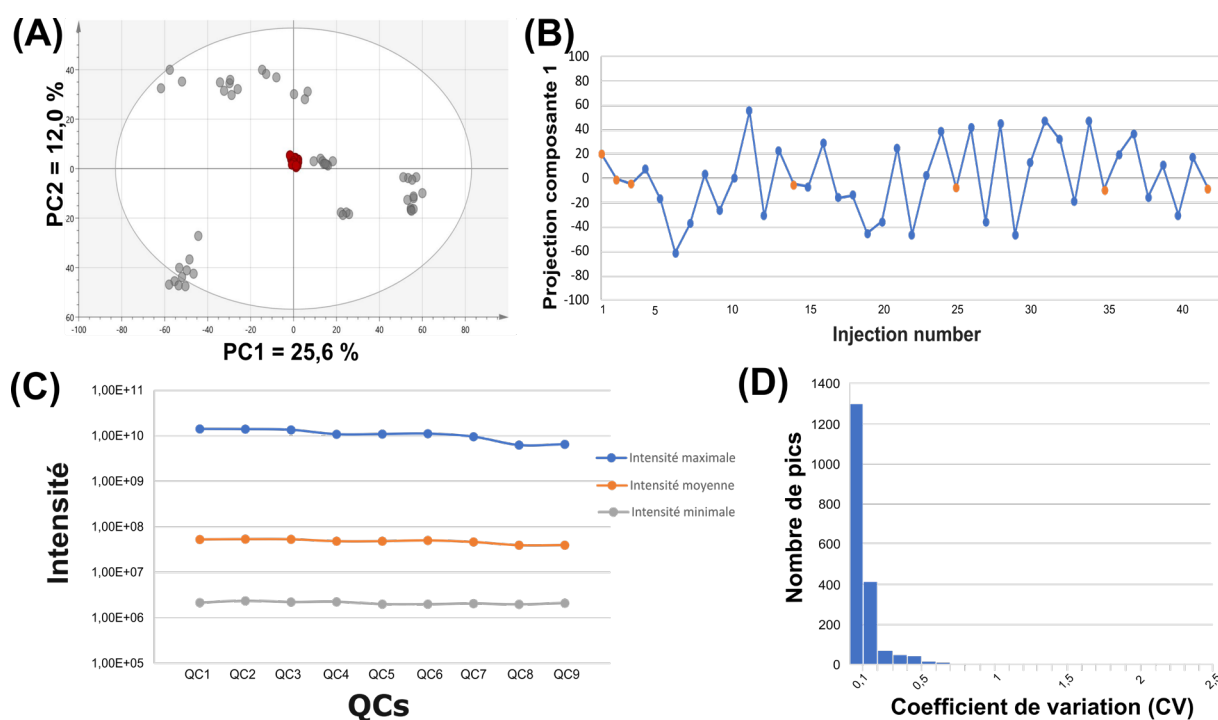


Figure 34 : Évaluation de la répétabilité et stabilité des mesures FT-ICR-MS : (A) répétabilité de la détection m/z pour l'ensemble des échantillons et QC (rouge) sur toute la gamme de m/z (B) projection de la composante de l'ACP au cours du temps (C) Graphique des intensités maximale, moyenne et minimale de l'ensemble des pics détectés pour chacun des 9 QC. (D) Histogramme des coefficients de variation (CV) des intensités des pics détectés pour l'ensemble des QC.

Un premier pré-traitement des données, visant à filtrer les masses pour garder uniquement celles présentes dans au moins deux tiers des répliques d'au moins une modalité, est alors appliqué.

Des formules élémentaires ont par la suite été attribuées, aux masses extraites, par le logiciel interne NetCalc 2015 v. 1. 1a (Helmholtz-Zentrum, Munich, Allemagne) (Tziotis *et al.*, 2012).

Pour cette annotation, les atomes C, H, O, N, S, et P sont considérés. Cet outil permet de créer un réseau de différences de masse et, en fonction des connexions construites, d'attribuer des formules élémentaires aux valeurs de m/z expérimentales. Cette attribution est basée sur la comparaison d'une liste de 6 masses de référence dont la formule élémentaire est connue. Cette première étape permet alors l'établissement d'un réseau liant les masses entre elles selon une liste de 176 potentielles réactions biochimiques retrouvées dans un système biologique. Ces réactions biochimiques sont donc associées à des différences de masses et permettent ainsi d'attribuer une composition élémentaire d'une masse encore inconnue avec une tolérance de 0,2 ppm. Les annotations ont été réalisées avec une tolérance d'erreur maximum de 1 ppm. Différents filtres au jeu de données sont appliqués tels que le retrait des pics satellites, l'identification de pics correspondant à des isotopes et enfin un filtre qui révèle les valeurs m/z présentant un défaut de masse inhabituel qui peuvent représenter du bruit ou des ions à charge multiple. Cette étape permet ainsi de réaliser une filtration des masses et ne garder uniquement celles, pouvant avoir une origine biologique pour établir la matrice de travail en vue des différentes analyses statistiques. Ces étapes donnent lieu à une réduction du nombre de masses utiles pour discriminer et décrire les échantillons (Figure 35).

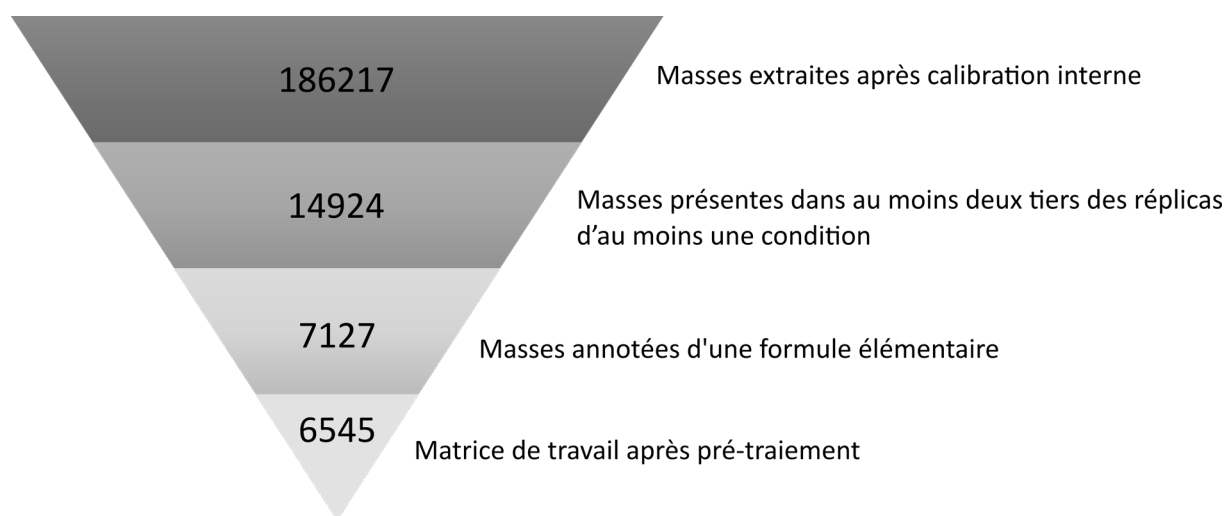


Figure 35 : Visualisation d'une réduction des données à chaque étape du pré-traitement

Le diagramme de van Krevelen est une représentation graphique du rapport entre le nombre d'atomes d'hydrogène et de carbone (H/C) en fonction du rapport entre le nombre d'atomes d'oxygène et de carbone (O/C) de l'ensemble des métabolites annotés d'une formule élémentaire. Pour exemple, le glucose dont la formule élémentaire est $C_6H_{12}O_6$ présente donc des coordonnées de 2 pour l'axe des ordonnées soit un rapport $12C / 6C$ et de 1 pour l'axe des abscisses avec un rapport $6O / 6C$ (Figure 36A). Ce diagramme donne également lieu à la

représentation de l'intensité relative de chaque formule élémentaire selon le diamètre du cercle. De plus, un code couleur est associé à chaque métabolite selon sa composition chimique. Ces diagrammes permettent de classer ces formules élémentaires selon leur appartenance à une hypothétique famille chimique (acides aminés, acides gras, carbohydrates, polyphénols etc...). Le diamètre du cercle renseigne également sur l'intensité relative de chacune de ces formules élémentaires. Enfin, ces dernières se voient attribuer un code couleur selon leur composition chimique (Figure 36B).

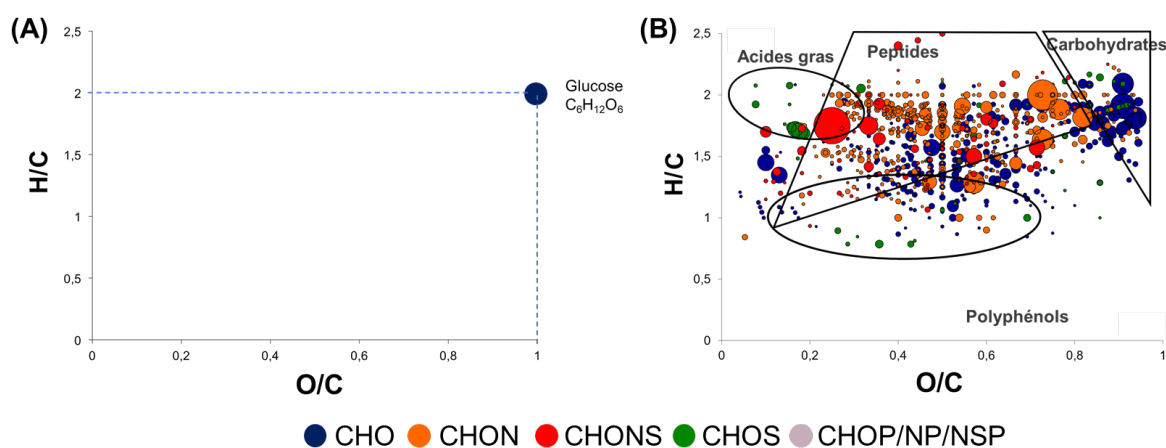


Figure 36 : Exemple de diagramme de van Krevelen (A) indiquant la position du glucose et (B) illustrant les zones ou les principales familles chimiques de composés sont retrouvées.

De plus, une autre représentation sous forme de diagramme circulaire, des différentes familles chimiques selon leur formule élémentaire établie d'après le calcul des ratios H/C, O/C, précédemment cités, a été générée à l'aide du script R MSCC (<https://github.com/PNNL-Comp-Mass-Spec/MSCC>) (Rivas-Ubach et al., 2018).

Le logiciel de traitement de données Perseus 1.5.1.6 (Max Planck Institute of Biochemistry, Allemagne) a été utilisé pour effectuer l'analyse en composantes principales (ACP), la classification ascendante hiérarchique (CAH) et l'analyse de variance (ANOVA). Pour la CAH, la distance euclidienne et le lien moyen ont été choisis et pour l'ANOVA, une valeur seuil de 0,05 a été retenue.

5.1.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol quadripolaire (LC-Q-TOF-MS)

Les vins post fermentation ont également été analysés par chromatographie liquide à ultra-haute performance (Dionex Ultimate 3000, ThermoFischer, Waltham, MA, Etats-Unis) couplée

à un spectromètre de masse MaXis plus MQESI-Q-ToF (Bruker, Bremen, Allemagne)(Figure 37).



Figure 37 : Spectromètre de masse UPLC-Q-TOF-MS : UHPLC Dionex Ultimate 3000 (ThermoFisher) couplée au spectromètre de masse Maxis plus MS ESI-Q-TOF (Bruker)

Les composés non polaires et faiblement polaires sont séparés par chromatographie liquide en phase inverse (RP-LC) sur une colonne Acquity UPLC BEH C18 1,7 m colonne 100 × 2,1 mm (Waters, Guyancourt, France). Les tampon A (acétonitrile 5% (v/v) avec 0,1% (v/v) d'acide formique) et tampon B (acétonitrile avec 0,1 % (v/v) d'acide formique) constituaient la phase mobile pour éluer les métabolites selon le gradient suivant : 5% (v/v) de tampon B de 0 à 1,10 min suivi d'une augmentation linéaire de la proportion du tampon B de 1,10 à 6,40 min pour atteindre 100% de ce dernier durant 3,6 min, avec un débit constant de 0,4 ml.min⁻¹ maintenu au cours de l'analyse. L'aiguille d'injection est rincée avant et après l'injection de l'échantillon (5µl) avec une solution de 10% (v/v) de méthanol. L'ionisation a été mise en œuvre en mode négatif avec une source d'ionisation électrospray selon une pression de nébulisation de 2 bars et un flux d'azote sec de 10 l.min⁻¹. Les paramètres du spectromètre de masse étaient les suivants : transfert d'ions (plaque d'extrémité offset à 500 V), tension capillaire (à 4500 V), et acquisition (gamme de masse de 100-1500 m/z). Avant chaque analyse, la solution ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent, Les Ulis, France), a été injectée directement dans la source

pour réaliser une calibration externe du spectromètre de masse. Cette calibration est menée en mode « enhanced quadratic » avec une erreur inférieure à 0,5 ppm, afin d’assurer le contrôle qualité de l’analyse. Un étalonnage interne permettant une recalibration post-acquisition a également été effectué. La solution ESI Tuning Mix dilué au quart dans de l’acétonitrile (v. 4.3, Bruker Daltonik GmbH) est injecté au début de chaque injection d’échantillons selon un système de dérivation. Des contrôles qualité entre les différents lots (mélange de peptides et de polyphénols standard) et au sein du lot (QC expérimental, mélange d’échantillons) sont réalisés afin de garantir la répétabilité et la stabilité du système au cours de l’analyse. Tous les échantillons ont été injectés de manière aléatoire dans le même lot pour éviter la variabilité d’un lot à l’autre. Aussi, les séquences sont organisées selon l’ordre décrit Figure 38.

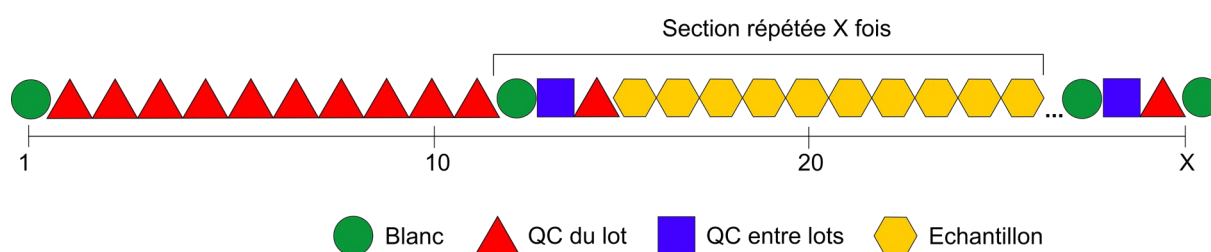


Figure 38 : Séquence d’analyse UPLC-Q-TOF-MS garantissant la qualité analytique

La préparation des échantillons consistait en la centrifugation du vin post fermentation alcoolique à 10500 $\times g$ pendant 10 min. Une fois analysés, les spectres de masses bruts de chacun des échantillons ont été recalibrés à l’aide du logiciel Compass DataAnalysis v4.3 (Bruker, Bremen, Germany), pour atteindre une déviation de masse après calibration de 0,5 ppm. Les associations m/z et temps de rétention (TR) aussi appelés features ont alors été extraits. L’ensemble des features de chacun des échantillons ont été alignés selon leur TR et leur masse avec une tolérance inférieure à 30 sec et 10 ppm, respectivement, à l’aide R MXSAlign (<https://github.com/daniellyz/MXSAlign>). Ce dernier permet également l’établissement d’une matrice comprenant l’ensemble des échantillons et tous les features détectés. Tout comme pour l’analyse FT-ICR-MS, une représentation globale des données à l’aide d’une ACP est réalisée avec le logiciel SIMCA afin de vérifier la répétabilité analytique. Cette étape est suivie d’un premier pré-traitement réalisé afin de ne garder uniquement les masses présentes dans au moins deux répliques sur trois dans au moins une des conditions.

La métabolomique permet de mettre en évidence des composés marqueurs des conditions étudiées mais également de les identifier par des informations structurales. Aussi, la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) participe à l’élucidation de la structure des

métabolites. Cette technique permet de soumettre les molécules à des états d'énergie supérieurs, les rendant instables et conduisant à la coupure de liaisons chimiques et une fragmentation de la molécule initiale. Aussi, à chaque scan effectué les features les plus intenses ont été fragmentés en appliquant la fonction AutoMS/MS de la LC-Q-TOF-MS, avec une fréquence de 2 ou 8 Hz selon la méthode utilisée. Ces fréquences de 2 et 8 Hz, permettent, respectivement, soit une fragmentation de composés cibles soit une fragmentation non ciblée d'un maximum de features. Les pics du métabolite d'origine et des fragments nouvellement formés sont alors visibles sur le spectre de masse du métabolite (Figure 39). Ces spectres MS/MS ont été extraits manuellement en utilisant Bruker Data Analysis 4.4 (Bruker Daltonic, Bremen, Allemagne). Ces spectres de masses présentant les fragments sont caractéristiques des métabolites et permettent leur identification par comparaison à des bases de données et/ou l'analyse de standards.

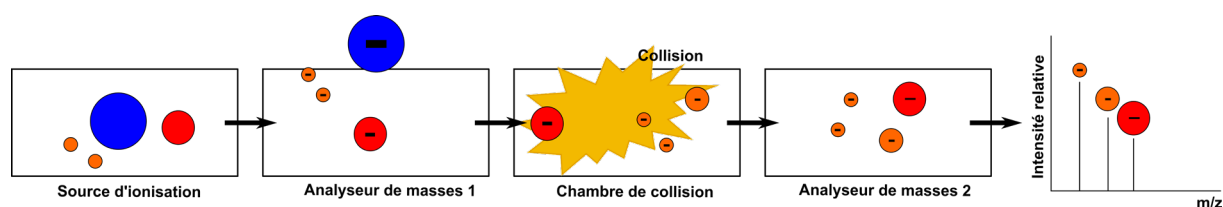


Figure 39 : Principe de fragmentation des ions en spectrométrie MS/MS

5.2. Identification des composés

De nombreuses bases de données ont été interrogées pour tenter d'identifier les marqueurs mis en évidence au cours des différentes analyses statistiques. Parmi elles, on retrouve des bases de données spécialisées telles que LipidMap pour l'annotation de lipides, ou encore Oligonet pour les peptides mais également des bases de données plus généralistes comme Metlin qui permet d'annoter des métabolites selon leur masse et les fragments associés issus d'analyse MS/MS. YMDB a été utilisée pour sa spécificité à l'organisme levurien, tandis que KEGG permet d'annoter des métabolites d'un organisme cible et les replacer dans les voies métaboliques associées. Ces bases de données présentent cependant des limites. En effet, selon l'organisme et la matrice étudiés, les bases de données ne sont pas équivalentes et présentes aujourd'hui encore des carences. De plus, toutes les bases de données ne sont pas incrémentées de la même façon et ne sont pas définies selon les mêmes critères. En outre, ces voies métaboliques peuvent ne donner qu'une vision partielle de la réalité. En effet, les voies métaboliques souvent représentées comme des successions de réactions indépendantes se révèlent être en réalité interconnectées, avec des intermédiaires communs formant un réseau

métabolique complexe. Aussi, il est nécessaire d'intégrer dans la démarche d'interprétation ces connexions.

En outre, l'identification des composés peut être évaluée selon des niveaux de confiance correspondant aux informations obtenues au cours des analyses (Figure 40). Ce système a été mis en place afin d'homogénéiser la présentation des résultats entre les différentes études menées en métabolomique. Un groupe de travail a défini en 2007 ces différents niveaux de confiance dans l'annotation des métabolites et les critères correspondants à ces niveaux (Sumner *et al.*, 2007). Certains travaux se sont basés sur les niveaux existants pour les faire évoluer afin de correspondre au mieux aux cas pratiques rencontrés (Schymanski *et al.*, 2014; Viant *et al.*, 2017).

Le niveau 5 de confiance correspond au niveau d'identification le plus bas qui correspond à la connaissance d'un rapport m/z et ou d'un temps de rétention (TR). Le niveau 4 se rapporte à l'attribution, d'une formule élémentaire, selon les données spectrales, au rapport m/z. Le niveau 3 indique qu'il a été possible d'associer une structure potentielle à l'aide d'une base de données à la formule élémentaire. Le niveau 2 témoigne du fait qu'une structure a été identifiée dans une base de données et confirmée par des données de fragmentation. Ce niveau 2 est un intermédiaire avant une identification confirmée, par comparaison aux résultats de fragmentation de composés standards, et correspond au niveau 1.

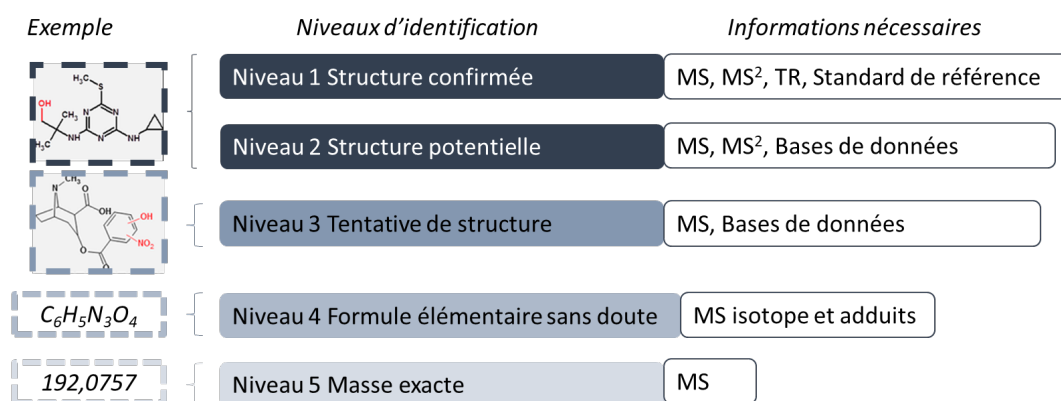


Figure 40 : Résumé des différents niveaux d'identification des composés en spectrométrie de masse à haute ou ultra-haute résolution (adapté d'après Schymanski *et al.*, 2015)

5.3. Dosage des composés volatils

L'analyse des composés volatils a été réalisée en partenariat avec deux laboratoires selon l'axe développé : Caractérisation des douze souches de *S. cerevisiae* et étude des interactions *S. cerevisiae* / *S. cerevisiae*. Les vins post-fermentations, avant analyse, ont été centrifugés 10

min à 2700×g puis filtrés sur membrane 0,22 µm avant d'être sulfités à une concentration finale de 30 mg.l⁻¹.

Le laboratoire LiBiFOOD de l'université de Barcelone (Espagne) a participé à l'étude de la caractérisation des douze souches de *S. cerevisiae* en utilisant la technique « HeadSpace-Solid Phase MicroExtraction-Gas Chromatography/Mass Spectrometry » (HS-SPME-GC/MS). 2 ml d'échantillon ont été placés dans un flacon de 10 ml avec un septum en silicone, puis placés dans un bain d'huile à 40°C sous agitation magnétique (700 rpm) pendant 10 min. La fibre SPME divinylbenzène/carboxène/polydiméthylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a été exposée à l'espace de tête de l'échantillon pendant 30 min. puis soumise à une désorption directe dans l'injecteur du chromatographe en phase gazeuse réglé. Les composés volatils ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse quadrupolaire à sélection de masse. L'analyse GC-MS a été réalisée en mode de balayage complet (SCAN) sur une gamme de masse de 30-300 *m/z*. La comparaison des spectres de masse et des temps de rétention avec des composés standards a permis d'identifier les composés. Dans certains cas, une identification provisoire a été effectuée sur la base des spectres de masse en utilisant la banque de données spectrales de 6 références de la bibliothèque de Wiley. L'évaluation quantitative des volatiles a quant à elle été basée sur des courbes d'étalonnage obtenues en analysant différentes concentrations de composés de référence dans une solution hydroalcoolique (éthanol 10% (v/v)). Les résultats ont été traités en effectuant une ANOVA ($\alpha = 0,05$), suivie d'un test post-Hoc, Tukey HSD. Tous les résultats ont été traités à l'aide du logiciel R (R-4.0.4).

Le laboratoire LAEE de l'université de Zaragoza (Espagne) a quant à lui participé à l'étude des interactions *S. cerevisiae* / *S. cerevisiae* via l'utilisation de deux techniques selon la catégorie de composés : majeurs et mineurs. La première a permis de quantifier les composés volatils dits majoritaires par Dichlorométhane MicroExtraction-Gas Chromatography / Flame Ionisation Detection (GC-FID) (Ortega et al., 2001). 3 ml de vin ont été placés dans des tubes à centrifuger de 15 ml à bouchon à vis, contenant 4,5 g de (NH₄)₂SO₄, 7 ml d'eau, 15 µl de solution standard interne C et 0,2 ml de dichlorométhane. Les échantillons ont été agités et centrifugés. La phase dichlorométhane a été récupérée et transférée dans un flacon pour analyse. Les analytes ont été séparés sur une colonne DB-20 de J&W Scientific (Folsom, CA, USA), d'une longueur de 50 m, un diamètre interne de 0,32 mm et une épaisseur de film de 0,5µm. La température de la colonne a été maintenue à 40°C pendant 5min, puis augmentée à 200°C à une vitesse de 3°C.min⁻¹. L'injection a été fixée pour 3µl en split à un débit de 30 ml.min⁻¹. Du

dihydrogène à un débit de 3 ml.min⁻¹ a été utilisé comme gaz porteur. La détection s'est faite par FID. La concentration de chaque composé spécifique a été déterminée par le calcul des zones de réponses relatives à l'étalon interne correspondant. La surface relative mesurée a ensuite été interprétée avec les graphiques d'étalonnage obtenus en analysant des vins synthétiques (éthanol à 2% (v/v), acide tartrique à 5 g.l⁻¹ et pH ajusté à 3,2 avec de l'hydroxyde de sodium 1 M) contenant des quantités connues de composés volatils.

L'analyse des composés volatils mineurs et à l'état de traces a été réalisée par « Solid-Phase Extraction -Gas Chromatography /Mass spectrometry (SPE-GC-MS) selon la méthode décrite par (López et al., 2002). Cette fraction a été analysée avec un chromatographe en phase gazeuse star 3400 CX couplé à un spectromètre de masse à piège à ions à impact électronique Saturn 4 (Varian). Avant analyse, les métabolites ont été séparés sur une DB-WAXetr (J&W, Folsom, USA) d'une longueur de 60 m, d'un diamètre interne de 0,25 mm et d'une épaisseur de film de 0,5 µm et précédée d'une précolonne non revêtue de 30 m × 0,32 mm. La température du four a été maintenue à 40°C pendant 5min, puis augmentée selon un gradient jusqu'à 230°C à une vitesse de 2°C.min⁻¹. Le gaz vecteur était de l'hélium à 1 ml.min⁻¹. 3 µl d'échantillons après extraction par SPE (station Vac ELUT 20 de Varian) ont été injectés dans un injecteur programmable (SPI) 1093 équipé d'un septum (Varian). La température initiale de cet injecteur était de 30°C pendant 0,6 min, puis a été portée à 230°C à 200°C.min⁻¹. Le chromatogramme de chaque ion détecté a été extrait pour être comparé aux standards chimiques et quantifié selon l'aire du pic correspondant. Les résultats ont été traités en effectuant une ANOVA ($\alpha = 0,05$), suivie d'un test post-Hoc, Tukey HSD. Tous les résultats ont été traités à l'aide du logiciel R (R-4.0.4).

5.4. Analyse sensorielle

Afin d'avoir un volume suffisant pour des analyses sensorielles descriptives, les répliques biologiques de chaque condition ont été assemblés. Les vins issus des fermentations alcooliques en moût de Chardonnay ont ensuite été filtrés sur cartouche avec un maillage de 0,22 µm et sulfités à 40 mg.l⁻¹ avant d'être mis en bouteille. Ces échantillons ont été conservés en cave à température constante jusqu'à l'analyse sensorielle.

L'ensemble des analyses sensorielles ont été réalisées à l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, dans une salle d'évaluation sensorielle équipée de boxes individuels. Pour chacune des séances, chaque échantillon a été codé par un numéro aléatoire à trois chiffres. Trente ml de chaque vin ont été servis à température ambiante dans des verres noirs ISO standard et

recouverts d'une boîte de Pétri en plastique. Les échantillons ont été évalués dans un ordre spécifique pour chaque panéliste suivant un carré latin.

a. Caractérisation des vins fermentés par les douze souches de *S. cerevisiae*

Les panelistes ont été recrutés parmi les étudiants en œnologie de l'école d'œnologie de Dijon de l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (IUVV). Ils ont tous suivi 56 h de formation à la dégustation du vin. 33 candidats ont été soumis à un processus de sélection au cours duquel leur capacité à identifier les principaux attributs des vins blancs a été vérifiée. Cette séance a été réalisée sur cinq vins, quatre assemblages de vins Chardonnay millésime 2015 (Hlohovec, Slovaquie), de Sauvignon blanc millésime 2016 (Roschbach, Allemagne) et de Muscat moelleux millésime 2017 (Narbonne, France) dont les proportions sont décrites Tableau 4 et un vin original de Chardonnay cité précédemment.

Tableau 10 : Proportion des différents vins issus d'assemblages

	Chardonnay	Sauvignon	Muscat
VIN 1	100 %	-	-
VIN 2	83%	-	17%
VIN 3	50%	50%	-
VIN 4	67%	27%	17%
VIN 5	83%	8,3%	8,3%

Chacun des vins, a été décrit selon la méthode de la fréquence de citation (Brice *et al.*, 2014). Il a été demandé au panel de décrire l'odeur de chaque échantillon en cochant les descripteurs associés dans une liste préétablie de 33 termes correspondant à des attributs olfactifs liés aux vins blancs. Cette liste a été adaptée de recherches précédentes Gonzalez-Ramos *et al.*, 2010 et est présentée Figure 41. Deux lignes vides ont été ajoutées à la liste afin de permettre aux participants d'utiliser leurs propres descripteurs. Pour chaque terme, la fréquence de citation a été établie pour chaque vin. Un score a été attribué à chaque paneliste, selon une comparaison des profils établis par chaque paneliste pour chaque vin à un profil établi au préalable par un expert. Les panelistes présentant un score supérieur à 20 / 100 ont été retenus.

Le panel final était donc composé de 22 évaluateurs (14 hommes, 8 femmes, âge moyen de 26 ans). L'évaluation sensorielle finale a été effectuée en une seule session (environ 45 min).

Nom :

Echantillon :

Prénom :

Sentir (au nez) chacun des vins présentés devant vous. Pensez à noter le numéro d'échantillon sur chacune des fiches.

Cochez les descripteurs qui correspondent **le mieux** à l'odeur de chaque échantillon :

- | | | |
|--|---------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> Terreux | <input type="checkbox"/> Beurre | <input type="checkbox"/> Citron |
| <input type="checkbox"/> Fruits rouges | <input type="checkbox"/> Vanille | <input type="checkbox"/> Ananas |
| <input type="checkbox"/> Pomme | <input type="checkbox"/> Floral | <input type="checkbox"/> Fruit de la passion |
| <input type="checkbox"/> Miel | <input type="checkbox"/> Végétal | <input type="checkbox"/> Serpillère mouillée |
| <input type="checkbox"/> Alcooleux | <input type="checkbox"/> Œuf pourri | <input type="checkbox"/> Chimique |
| <input type="checkbox"/> Boisé | <input type="checkbox"/> Pamplemousse | <input type="checkbox"/> Poivron vert |
| <input type="checkbox"/> Fruité | <input type="checkbox"/> Poire | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> Herbacé | <input type="checkbox"/> Toasté | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> Agrumes | <input type="checkbox"/> Epicé | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> Rose | <input type="checkbox"/> Rance | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> Pétrolé | <input type="checkbox"/> Pêche | <input type="checkbox"/> |

Figure 41 : Fiche d'évaluation des vins selon la méthode de la fréquence de citation

Les douze échantillons ont été décrits selon la méthode précédemment citée. Pour chaque terme, la fréquence de citation a été établie pour chaque vin. Seuls les descripteurs mentionnés au moins 4 fois pour au moins un vin ont été conservés pour l'analyse statistique. Les autres descripteurs ont été supprimés. Les données sensorielles ont été soumises à une analyse des correspondances (CA) ($\alpha = 0,05$), puis à une CAH, sur les coordonnées des loadings de la CA, des vins selon les variables présentant une différence significative.

b. Etude de l'impact des interactions *S. cerevisiae* / *S. cerevisiae* sur le profil sensoriel des vins

Dix experts en vin ont été recrutés pour cette étude (quatre femmes et six hommes ; âge médian, 40 ans ; fourchette : 25-56 ans). Ils étaient pour la plupart des chercheurs, étudiants ou professeurs en œnologie et tous des dégustateurs réguliers. Les dix panelistes ont bénéficié de séances préliminaires pour vérifier leur capacité à reconnaître les attributs typiques des vins de Chardonnay. L'ensemble des séances associées à cette étude ont été réalisées à l'aide de l'interface Redjade (<https://my.redjade.net>). Cette interface permet la mise en ligne de questionnaires personnalisés pour l'évaluation sensorielle d'échantillons. Le panel a ainsi pu réaliser l'évaluation en ligne sur tablettes connectées.

La sélection du panel s'est déroulée en deux séances de 30 min chacune. Une première a été l'objet d'une description de trois vins de Chardonnay et un aligoté (Aligoté millésime 2018 (Domaine de l'Université, Marsannay, France), Macon millésime 2017 (Vignerons des Terres Secrètes, La Roche Vineuse, France), Macon Fleurs Blanches millésime 2019 (Cave de Viré-Clessé, Viré-Clessé, France), Ardèche, millésime 2019 (Louis Latour, Beaune, France)) par la méthode de la fréquence de citation (Brice et al., 2014). De plus, les deux derniers vins ont été répétés pour évaluer la répétabilité du jury. Une description des vins selon la méthode de notation de l'intensité d'attributs, typiques de Chardonnay, sélectionnés (Figure 42) sur une échelle de huit points allant de "absent ou manquant" (score =0) à "très fort / très intense" (score=7).

Evaluez l'intensité de chaque descripteur à l'aide de l'échelle :

0 : pas du tout intense
7 : très intense

Intensité des descripteurs :

	0	1	2	3	4	5	6	7
Floral	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fruits blancs (pomme, poire,...)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fruits jaunes (Pêches, abricot,...)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Boisé (vanille, toast,...)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Végétal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Amylique (banane, bonbon anglais,...)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fruits exotiques (ananas, fruits de la passion,...)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Agrumes (citron, pamplemousse,...)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Alcooleux	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Figure 42 : Interface d'un bulletin de réponse pour la séance de sélection

L'ensemble des panelistes se sont avérés répétables sur les deux vins présentés en duplicatas et performants quant à la description des vins. Aussi, l'ensemble du panel a été conservé.

Pour chaque échantillon issu de l'étude des interactions, les évaluateurs ont été invités à noter l'intensité des attributs sélectionnés au préalable pour leur représentativité des échantillons (Figure 43) sur une échelle de huit points allant de "absent ou manquant" (score =0) à "très fort / très intense" (score=7). Les données sensorielles ont été soumises à une ANOVA et au test de Newman-Keuls ($\alpha = 0,05$).

Évaluez l'intensité de chaque descripteur à l'aide de l'échelle, **uniquement au nez** :
N'hésitez pas à utiliser la totalité de l'échelle

0 : pas du tout intense
7 : très intense

	0	1	2	3	4	5	6	7
Fruits blancs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vanille	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fruits jaunes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fruits confits	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Agrumes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Oxydation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ananas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Floral	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Amylique	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vernis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Végétal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Réduction	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Figure 43 : Interface d'un bulletin de réponse pour la séance d'évaluation

Les analyses statistiques pour l'ensemble des données sensorielles ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R-4.0.4).

CHAPITRE 1

CARACTERISATION INTRASPECIFIQUE CHEZ *S. CEREVISIAE*

Contexte

Au travers de la synthèse bibliographique, il a été rapporté une importante diversité intraspécifique chez *S. cerevisiae* au sein même de la niche écologique raisin-vin. Néanmoins, les approches utilisées pour décrire cette diversité sont majoritairement ciblées. Ces dernières consistent pour la majorité à quantifier des composés volatils décrits pour avoir un impact sensoriel.

Depuis, le développement du concept d'œnomique dans les années 2000, l'approche métabolomique a considérablement contribué aux connaissances existantes quant à la composition des vins. En parallèle, cette approche a également été appliquée à l'étude du métabolisme des micro-organismes. Cette approche non ciblée utilisant la spectrométrie de masse à ultra haute résolution (uHRMS) offre une vision plus complète du métabolome.

Néanmoins, il reste essentiel, dans le secteur œnologique, de définir les performances fermentaires et de croissance, de chacune des souches, dans la matrice d'étude ainsi que leur impact sur le profil aromatique et sensoriel des vins. Aussi, nous avons combiné, la FT-ICR-MS, un outil puissant, avec différentes approches ciblées pour développer une vision intégrative de cette diversité intraspécifique au sein de l'espèce. Ainsi, le suivi des paramètres œnologiques et de la croissance des levures en fermentation a été associé à une approche ciblée pour identifier le volatilome exprimé à la fin de la fermentation alcoolique et une analyse sensorielle de chacun des vins associés a été réalisée.

Selon cette approche intégrative, l'objectif de ce chapitre est de caractériser douze souches de *Saccharomyces cerevisiae* commercialisées par la société Lallemand, ainsi que leur impact sur les vins issus de la fermentation alcoolique d'un moût de Chardonnay.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal *Microorganisms* en Novembre 2021 (<https://doi.org/10.3390/microorganisms9112327>). L'ensemble des données supplémentaires sont disponibles à l'adresse suivante : <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms9112327/s1>.

Article



microorganisms

an Open Access Journal by MDPI



Different Wines from Different Yeasts? “*Saccharomyces cerevisiae* Intraspecies Differentiation by Metabolomic Signature and Sensory Patterns in Wine”

Fanny Bordet; Chloé Roullier-Gall; Jordi Ballester; Stefania Vichi; Beatriz Quintanilla-Casas; Régis D. Gougeon; Anne Julien-Ortiz; Philippe Schmitt Kopplin; Hervé Alexandre

Microorganisms 2021, Volume 9, Issue 11, 2327

Received: 20 September 2021; Accepted: 1 November 2021; Published: 5 November 2021

Different Wines from Different Yeasts “*Saccharomyces cerevisiae* Intraspecies Differentiation by Metabolomic Signature and Sensory Patterns in Wine”

Fanny Bordet ^{1,2,*}, Chloé Roullier-Gall ¹, Jordi Ballester ³, Stefania Vichi ⁴, Beatriz Quintanilla-Casas ⁴, Régis D. Gougeon ^{1,5}, Anne Julien-Ortiz ², Philippe Schmitt Kopplin ⁶ and Hervé Alexandre ¹

¹ Université Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France-Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (IUVV), Rue Claude Ladrey, BP 27877, CEDEX, 21078 Dijon, France; Chloé.Roullier-Gall@u-bourgogne.fr (C.R.-G.); regis.gougeon@u-bourgogne.fr (R.D.G.); rvalex@u-bourgogne.fr (H.A.)

² Lallemand SAS, 19 Rue des Briquetiers, CEDEX, 31700 Blagnac, France; ajulien@lallemand.com

³ Centre des Sciences du Goût et de l’Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne-Franche-Comté, F-21000 Dijon, France; jordi.ballester@u-bourgogne.fr

⁴ Food Science and Gastronomy Department, University of Barcelona, Nutrition, INSA (Institut de Recerca en Nutricio I Seguretat Alimentaria), 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain; stefaniavichi@ub.edu (S.V.); beatrizquintanilla@ub.edu (B.Q.-C.)

⁵ DIVVA (Développement Innovation Vigne Vin Aliments) Platform/PAM UMR, IUVV, Rue Claude Ladrey, BP 27877, CEDEX, 21078 Dijon, France⁶ German Research Center for Environmental Health, Research Unit Analytical BioGeoChemistry, Helmholtz Zentrum München, D-85764 Neuherberg, Germany; schmitt-kopplin@helmholtz-muenchen.de

* Correspondence: bordet.fanny@gmail.com

Abstract: Alcoholic fermentation is known to be a key stage in the winemaking process that directly impacts the composition and quality of the final product. Twelve wines were obtained from fermentations of Chardonnay must made with twelve different commercial wine yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. In our study, FT-ICR-MS, GC-MS, and sensory analysis were combined with multivariate analysis. Ultra-high-resolution mass spectrometry (uHRMS) was able to highlight hundreds of metabolites specific to each strain from the same species, although they are characterized by the same technological performances. Furthermore, the significant involvement of nitrogen metabolism in this differentiation was considered. The modulation of primary metabolism was also noted at the volatilome and sensory levels. Sensory analysis allowed us to classify wines into three groups based on descriptors associated with white wine. Thirty-five of the volatile compounds analyzed, including esters, medium-chain fatty acids, superior alcohols, and terpenes discriminate and give details about differences between wines. Therefore, phenotypic differences within the same species revealed metabolic differences that resulted in the diversity of the volatile fraction that participates in the palette of the sensory pattern. This original combination of metabolomics with the volatilome and sensory approaches provides an integrative vision of the characteristics of a given strain. Metabolomics shine the new light on intraspecific discrimination in the *Saccharomyces cerevisiae* species.

Keywords : yeast; *Saccharomyces cerevisiae*; Chardonnay wine; metabolomic; volatile compounds; sensory analysis

I. Introduction

Targeted approaches are mostly used for metabolite analysis in oenology. However, they do not enable the study of the diversity of metabolites in a matrix, so only a limited number of compounds is considered. These approaches contribute to answering a specific question, while untargeted approaches allow a holistic perspective. Non-targeted approaches using high-resolution mass spectrometry (uHRMS) provide a more comprehensive view of the metabolome. Thanks to these high-throughput analyses, it is possible to account for the chemical diversity of a complex matrix and bring to light not only known compounds but also previously unidentified compounds. Already frequently used in the fields of medicine, agro-environment, and nutrition, uHRMS has also been applied since the early 2000s to the wine matrix, with the development of the concept of “oenomics” [1], which covers different aspects. Vaclavik *et al.* [2] were able to discriminate three red wines according to their variety by wine-metabolome analysis. Wines can also be discriminated by their biogeographic origins [3,4]. Moreover, it was shown that this approach could be used to authenticate wines and evaluate their quality [5]. On the other hand, the impact of ageing [4,6] and the modification of the matrix by oxidation are topics that are widely addressed by this metabolomic approach [7-10].

Besides oenomics, metabolomics have been applied for over a decade to understand the metabolism of microorganisms [11,12]. Metabolomics can provide, at a given moment, a representation of the cell phenotype according to genetic background and its expression under specific environmental conditions, offering indications of possible biochemical regulations that cannot be quantified by other omics approaches [13]. High-resolution mass spectrometry (HRMS) is used to profile and globally describe the non-volatile metabolome changes associated with metabolic conditions based on the simultaneous measurement of several thousand signals due to high sensitivity, resolution, and mass accuracy [14].

The impact of microorganisms on different matrices, including wine, was addressed in studies by Schmitt-Kopplin *et al.* and Garcia *et al.* [15,16]. Thus, metabolomics has made it possible to discriminate between wines produced by different yeasts or yeast couples. Roullier-Gall *et al.* were able to distinguish several finished wines with a characteristic composition, strain, or mix of strains used for fermentation [17]. This approach also allowed us to highlight differences in metabolism between different species, as well as within the same species of yeast, under specific conditions. For example, different strategies developed by two *Saccharomyces* species for cold resistance were observed on the level of various metabolisms, such as lipid metabolism and the shikimate pathway [18]. Additionally, differences were reported within the *Saccharomyces cerevisiae* species, notably in the volatile compounds formed [19-21]. These differences probably reflect differences in the metabolism of the strains that have not been explored. The innovative aspect of our study is to investigate, for the first

time, the metabolomic differences among different strains belonging to the same species. Indeed, we demonstrated that each of the twelve studied strains possess a specific non-volatile metabolomic signature that allows us to discriminate them and address intraspecific diversity. We novelly combined uHRMS, a powerful tool, with different targeted approaches to develop an integrative vision of this intraspecific diversity within the species. Furthermore, the monitoring of oenological parameters and of the growth of yeasts in fermentation were associated with a targeted approach to identify the volatilome expressed at the end of alcoholic fermentation. Additionally, a sensory analysis of each of the associated wines was performed.

II. Materials and Methods

2.1. Yeast Strains

Twelve commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* (Lallemand Inc, Montreal, Canada) were selected for this study. Each strain was supplied as an ADY and stored at 4 °C once opened. These strains were coded S1 to S12.

2.2. Growth and Fermentation Conditions

Each strain was rehydrated from ADY stock and then diluted at 0.1% (v/v) concentration in 150 mL of YPD medium (0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) bactopectone, 2% (w/v) glucose, and 0.02% (w/v) chloramphenicol) in 250 mL Erlenmeyer flasks. After incubation at 28 °C with stirring (150 rpm) for 18 h, the second culture, in 150 mL of pasteurized Chardonnay must, filtered on a 0.22 µm membrane was performed in Erlenmeyer flasks (250 mL) at 28 °C in static mode for 18 h. These later cultures were used to inoculate pasteurized Chardonnay must containing 226.6 g/L glucose/fructose, pH 3.92, and 343.1 mg/L total assimilable nitrogen, at 1×10^6 viable cells/mL. These fermentations were performed in 2 L bottles containing 1 L of inoculated must covered with sterile cotton wool. For each strain, assays were conducted in four biological replicates at 20 °C without stirring. The end of fermentation was considered as the total depletion of sugars.

2.3. Monitoring of Biomass Growth

Cell viability in preculture and during fermentation was determined by flow cytometry. The fluorochrome used was cFDA (5-6 carboxyfluorescein diacetate) (Invitrogen, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, Illkrich, France) dissolved in acetone at a concentration of 1500 µM (Longin *et al.*, 2017). We added 3 µL of cFDA to 100 µL of diluted yeast suspension in Mc Ilvain buffer (100 mM citric acid, 200 mM Na₂HPO₄, pH 4). Samples were incubated in the dark 20 min before measurement. Flow cytometry was performed with a BD Accuri C6 flow cytometer, and the resulting data were processed using the BD Accuri C6 software. For each sample, 20 µL was analyzed at 34 µL/min. The FSH threshold used was 80,000. A 488-nm wavelength argon laser was used to excite the cells (autofluorescence) and dye them. CFDA fluorescence was

measured on the FL1-H long pass filter (533/530 nm) and side-scatter light (SSC)/fluorescence intensity data were analyzed. Daily sampling of all the samples was carried out.

2.4. [Analytical Methods](#)

2.4.1. [Oenological Analysis](#)

Samples were centrifugated at $28,000\times g$ for 5 min at 4 °C. Sugar concentration and ethanol degree were monitored daily by FTIR (Fourier-transformed infrared) spectroscopy (OenoFOSS™, FOOS, Hilleroed, Denmark). Daily sampling of all the samples was carried out.

2.4.2. [Volatilome Analysis](#)

Headspace solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry, as reported previously [23,24], was used to quantify volatile compounds at the end of alcoholic fermentation for three of four biological replicates.

In brief, 2 mL of sample was placed in a 10 mL vial with a silicone septum and then placed in an oil bath at 40 °C with a magnetic stirrer (700 rpm) for 10 min. A divinylbenzene/carboxene/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was exposed to the sample headspace for 30 min and then subjected to direct desorption in the injector of the gas chromatograph 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-unit range. The comparison of mass spectra and retention times with standard compounds allowed for the identification of compounds. In a few cases, a tentative identification was carried out based on the mass spectra using Wiley's library 6-reference spectral databank. The quantitative assessment of volatiles was based on calibration curves obtained analyzing different concentrations of reference compounds in 10% hydroethanolic solution. The results were processed by performing an ANOVA (p-value < 0.01), followed by a Tukey test. All the results were processed using R software (R-4.0.4).

2.4.3. [Non-Volatile Metabolome Analysis](#)

Ultra-high-resolution mass spectra were acquired using an FT-ICR-MS (SolariX, Bruker Daltonik, Bremen, Germany) equipped with a 12 Tesla superconducting magnet (MagneX Scientific Inc., Kidlington, UK) and an Apollo II electrospray ionization source (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) operated in negative ionization mode. Samples were collected at the end of alcoholic fermentation and diluted at 5 :100 v/v in pure methanol (LC-MS grade, Fluka, Germany). Quality controls (QC) were prepared by pooling equal amounts of all samples. QCs were analyzed at the beginning and end of the run and every ten samples to validate the repeatability of the measurement. The diluted samples and QC samples were injected at a flow rate of 120 $\mu\text{L}/\text{h}$ into the

electrospray ion source. Spectra were acquired with a time domain of 4 megawords within a mass range of m/z 147–2000. A total of 300 scans was accumulated for each sample. All the samples were injected randomly in the same batch to avoid batch variability. A resolving power of 400,000 at 300 m/z was achieved. All the spectra were calibrated externally on a methanol solution of arginine clusters (10 mg/L), and accuracy reached values of less than 0.1 ppm in day-to-day measurements. Additionally, internal calibrations were performed on a list composed by recurrent compounds in wine to keep only m/z peaks with a signal-to-noise (S/N) ratio of 4. Matrix Generator software (v. 0.4, Helmholtz-Zentrum Muenchen) was used to align each peak with a mass-accuracy window of 1 ppm. The quality of the analysis was controlled before any data processing (Supplementary Figure S1). Features were annotated using the in-house software NetCalc 2015 (v.1.1a, Helmholtz-Zentrum Muenchen). Finally, van Krevelen diagrams were generated by an Excel file according to the H/C versus O/C ratio of annotated metabolites. Annotation levels were in line with Viant *et al.*, 2017 [25]. Perseus 1.5.1.6 (Max Planck Institute of Biochemistry, Germany) was used to perform principal-component analysis (PCA), hierarchical cluster analysis (HCA), and analysis of variance (ANOVA). For HCA, the Euclidean distance and average linkage were chosen, and a threshold p -value of 0.05 was chosen for ANOVA. Multidimensional Stoichiometric Compounds Classification (MSCC) have been used to elucidate extracted biomarkers categories commonly defined as lipids, peptides, amino sugars, carbohydrates and polyphenols derivatives compounds [26].

Metabolites were identified by ultra-high-performance liquid chromatography (Dionex Ultimate 3000, ThermoFischer, Waltham, MA, USA) coupled to a MaXis plus MQ ESI-Q-ToF mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany). A reversed-phase liquid-chromatography (RP-LC) separation method was applied by injecting 5 μ L in an Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m column 100 \times 2.1 mm (Waters, Guyancourt, France) to separate metabolites according to their polarity. Buffer A (acetonitrile 5% (v/v) with 0.1% (v/v) formic acid) and buffer B (acetonitrile with 0.1% (v/v) formic acid) were employed to elute metabolites. Detection was implemented in negative ionization mode with the following parameters: an electrospray (Nebulizer pressure = 2 bars and nitrogen dry gas flow = 10 L/min), ion transfer (end plate offset at 500 V) capillary voltage (at 4500 V), and acquisition (100–1500 m/z mass range).

A mix of standard peptides and polyphenols was used for the UHPLC-Q-ToF-MS quality control. Experimental quality control (mix of samples) was used to guarantee system repeatability. All the samples were injected randomly in the same batch to avoid batch-to-batch variability. Calibration was processed with $\frac{1}{4}$ diluted ESI Tuning Mix (v. 4.3, Bruker Daltonik GmbH). Features (couple of m/z -values and retention times) were fragmented using the AutoMS/MS function on the most intense features, with a frequency of 2 Hz. Fragmentation was done at three different collision energies: 15, 25, and 35 eV. After acquisition, MS/MS spectra were manually extracted using Bruker Data Analysis 4.4 (Bruker Daltonic, Bremen, Germany).

2.5. Descriptive Sensory Analysis

In order to have enough volume per sample to carry out descriptive sensory analysis, the four biological replicates of each yeast modality were pooled. The twelve post-alcoholic fermentation wines were then filtered and sulfited to 40 mg/L before bottling. These samples were stored in the cellar at a constant temperature for one month until sensory analysis.

The assessors were recruited from among the enology students at the Dijon School of Enology at the Institut Universitaire de la Vigne et du Vin. They all attended 56 h of training in winetasting. The 33 candidates were subjected to a selection process during which their ability to identify the main white wine attributes and their reproducibility was checked. The final descriptive panel was composed of 22 assessors (14 males, 8 females, average age of 26).

The final sensory measure was carried out in a single session divided into two series of twelve samples (about 45 min per series). The session was conducted in a sensory evaluation room with individual boxes. Each sample was coded by a three-digit random number. Thirty mL of each wine was served at room temperature in standard ISO black glasses and covered with a plastic Petri dish. The samples were assessed in a specific order for each panelist following a Latin square. Samples were described according to the frequency-of-citation method [27]. The panel was asked to describe the odor of each sample by checking the associated descriptors within a pre-established list of 33 terms corresponding to odor attributes related to white wines. The list was adapted from previous research [28] and is presented in Supplementary Material, Table S1. Two blank lines were added to the list in order to allow the participants to use descriptors that were missing from the list, so they could add their own descriptors. For each term, the frequency of citation was established for each wine. Only the descriptors mentioned at least 4 times for at least one wine were kept for statistical analysis. The other descriptors were removed. The sensory data were subjected to correspondence analysis (CA) ($\alpha = 0.05$), followed by hierarchical cluster analysis on the wine coordinates of the most relevant CA factors. Sensory statistical analyses were performed using R software (R-4.0.4).

III. Results and Discussion

Twelve *Saccharomyces cerevisiae* strains were screened. All these strains were selected for their phenotypic diversity, diverse origins, and genetic backgrounds. The twelve strains were commercial stains widely used in the wine industry. For example, S2 was obtained by an adaptative evolution from strain S1 [29]. Strain S7 was a natural hybrid of strain S10 that had been crossed with another *Saccharomyces cerevisiae* strain, and S6 was a hybrid obtained by UV mutagenesis [30]. All the strains exhibited different nitrogen requirements [31,32], which can be associated with different profiles of aromatic compound formation [33].

3.1. [Fermentation Kinetics and Yeast Viability](#)

Alcoholic fermentation of Chardonnay must inoculated by 12 different yeast strains was monitored by IRTF spectroscopy (OenoFoss) and flow cytometry every day until the end of fermentation. All twelve strains showed similar growth and fermentation kinetics or patterns. The results of some fermentation parameters are expressed in the table in the supplementary data (Table S2). The strains all showed a rapid exponential phase (48 h). No residual sugars remained at the end of the monitoring period, except for strain S8 (Supplementary Table S2). This last yeast reached dryness at 264 h. The maximum population was within the range of 7.95×10^7 to 1.46×10^8 viable cells/mL. The ethanol yield was whatever the strains, which was in accordance with previous studies [34-36]. S12 consumed 20% of initial malic acid, which had already been described earlier [37]. Comparable kinetics were observed between the strains, which was expected since all the strains belonged to the same species and were selected for their alcoholic fermentation performances [38,39].

3.2. [Specific Footprinting of Strains](#)

In our experiment, the twelve strains fermented the same must; thus, in these conditions, our metabolomic analysis reflected the specific traits of each strain. Indeed, statistical analysis of our data revealed a unique footprint for each of the strains studied.

A principal-component analysis (PCA) was performed on the FT-ICR-MS data to display the differences in the metabolomic composition of wine by representing the biological replicates of each strain. The PCA score plot of the two first components (Figure 1A) explained 37.9% of the metabolic variation. This representation highlighted the great proximity of the replicates for a given strain. At the strain level, this projection on these two axes allowed for separation of strains based on the metabolite produced and revealed high metabolic diversity. Our non-targeted analysis allowed us to report, for the first time, considerable metabolic differences between strains within the same species.

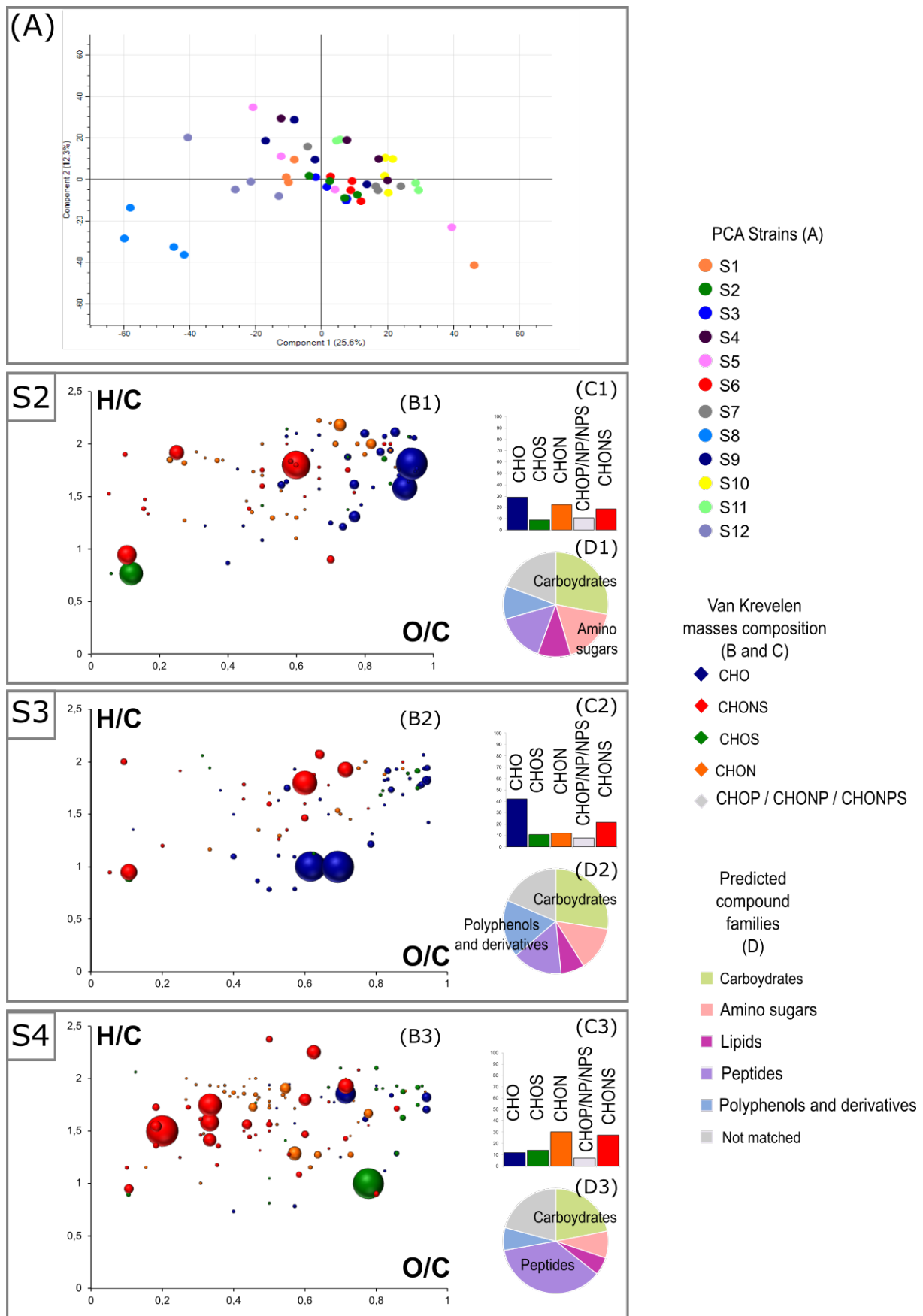


Figure 1.1: (A) Principal-component analysis of twelve *Saccharomyces cerevisiae* strains based on FT-ICR-MS data using direct methanol dilution. ANOVA ($p < 0.05$) was used to extract specific markers for each of the twelve strains: S2, S3 and S4 are represented as examples. For each strain, H/C vs O/C van Krevelen diagrams (B),

histogram proportions that show their elemental compositions (C), and a pie chart (D) representing the distribution of these markers by hypothetical families of common wine compounds are presented. Bubble sizes indicate relative intensities of corresponding masses. Color code: CHO, blue; CHON, orange; CHONS, red; CHOS, green.

The first principal component accounted for 25.6% of the variation and enabled the clear differentiation of the related strain as S1 and its adaptative evolution as S2. This first study of the exometabolome of twelve strains of the same species under fermentative conditions also reflected metabolically different strains that are associated with phenotypic differences. For example, the relevant separation, according to axis 1 of strain S8 to the other strains, may be related to the sluggish fermentation described earlier. A significant change in the exometabolome seemed to contribute to this phenomenon, consistent with the impact of various known metabolites already described [40,41].

A total of 58,392 masses detected in FT-ICR-MS was extracted. Of these, the unique masses were excluded for further data processing. As a result, 2685 masses (Level 4) were retained. Then, among these masses, 2179 could be associated with a molecular formula (Level 3). Among them, it was possible to distinguish molecular formulas that were unique to a strain from a molecular formula whose abundance varied significantly, depending on the strain. Molecular formulas that presented significant differences in their mean intensity between all twelve strains were extracted by performing ANOVA statistical analyses (p -value < 0.05) and were considered as biomarkers. For each of these, their mass was subjected to different databases (KEGG, MassTriX, Metlin, YMDB) for putative annotation (Level 2).

Despite a similar metabolic background shown in the representation of common masses (Supplementary Figure S2), the strains were differentiated from each other by a pool of specific compounds extracted statistically (Table 1.1). Out of the 2179 molecular formulas, 1380 were common to all strains. Thus, 36.7% of the detected non-volatile composition was different, depending on the strain. As stated above, this proximity could be explained by the fact that all the strains belong to the same species and have very close genetic backgrounds [42] S8, which stood out with PCA, unsurprisingly had the highest number of specific markers (1162) (Table 1.1).

Table 1.1: Table of extracted, annotated, and identified metabolites according to wine fermented by each strain of Saccharomyces cerevisiae (S1 to S12).

Strains	Number of Extracted Masses	Number of Biomarkers (Level 4)	Unique Molecular Formulas	Tentative Structure (Level 3)	Fragmented Biomarkers (Putative Identification Level 2)	Validated Identification (Level 2)
S1	1513	133	0	6	1	0
S2	1588	208	0	16	5	1
S3	1507	127	0	8	4	2
S4	1669	289	0	15	3	0
S5	1508	128	0	5	0	0
S6	1545	165	0	7	5	0
S7	1510	130	0	7	1	0
S8	2576	1162	34	37	10	4
S9	1602	222	0	17	3	1
S10	1782	402	0	21	2	0
S11	1689	309	0	15	0	0
S12	2051	668	3	32	0	0

Looking further ahead, it was very interesting to know the nature of the differences in chemical composition of biomarkers for each strain. The set of biomarkers for a given strain matched their metabolomic footprint, which was previewed by van Krevelen diagrams. The van Krevelen diagrams were based on their O/C and H/C ratios (Figure 1.1). The wide range of biomarkers of each strain and its composition highlighted the diversity of metabolisms among these strains. Differences in both quantitative and chemical composition could be observed. This metabolic diversity was also illustrated by associated histograms of proportion-marker composition for each strain (Figure 1.1, Supplementary Figure S1.3). Thus, S3 was predominantly associated with CHO markers in the area of the van Krevelen diagram where carbohydrate- and polyphenol-derivative compounds were expected. On the contrary, the S4 profile appeared distinctly different from the other strains, with markers mainly composed of CHON and CHONS. The latter were located in the area associated with peptides on the van Krevelen diagram and whose composition is in agreement with Rivas-Ubach *et al.*, 2018 [26]. S5 and S7 were characterized by a large number of CHO, closely followed by CHON, and finally, CHONS.

Furthermore, to determine the impact of each strain on their biomarkers, we extracted biomarkers that were significantly more intense (Figure 1.2.A) and less intense (Figure 1.2.B) for each strain. The histogram proportions show the differences in qualitative elemental composition, and the pie charts support the prediction of the families of compounds that can be attributed to each feature. A diagram representing the H/C ratio as a function of the m/z ratio combined with the intensity of each of the features according to their m/z was used. This alternative representation provided additional information on the molecular weight of the biomarkers. All the features were in the mass range of 150 to 650 m/z. We found that the features extracted showed a large variability in composition between those that were less and more intense (Figure 1.2 and Supplementary Figure S1.4). For example, we observed that for strain S1,

the significantly more intense markers were mainly composed of nitrogen-containing compounds (potential peptides and polyphenol-derivative compounds), while the less intense ones were mostly associated with CHO markers in the area of the van Krevelen diagrams where carbohydrate compounds were expected. Biomarkers of S2, whether they were more or less intense, presented peaks with lower intensity in comparison with the other strains.

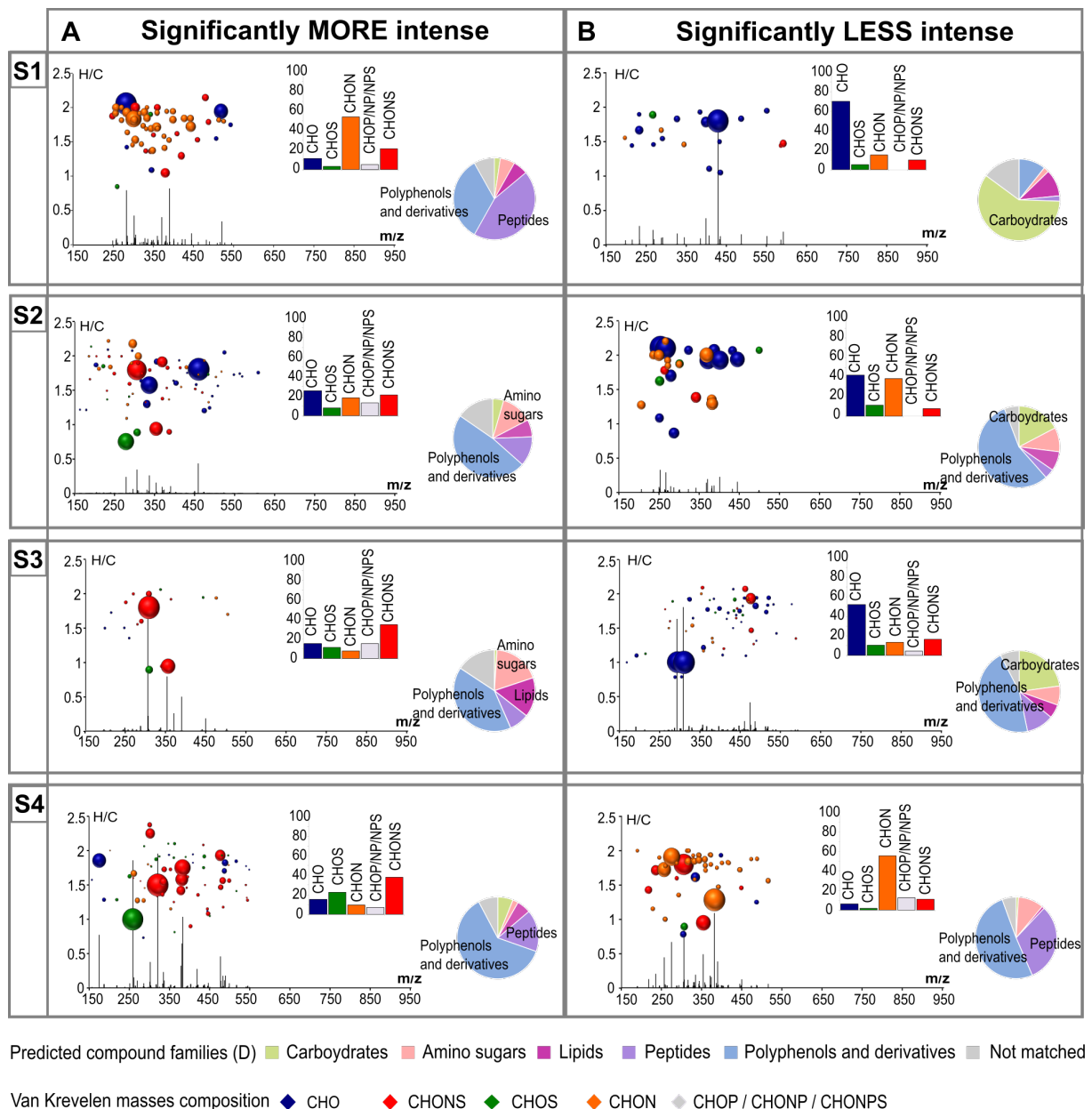


Figure 1.2: H/C vs m/z van Krevelen diagrams combined with intensity vs m/z diagrams coupled to histogram proportions of the elemental formula compositions exhibit specific strain markers significantly less (B) and more (A) intense in each fermentation. Bubble sizes indicate relative intensities of corresponding masses. Color code : CHO, blue; CHON, orange; CHONS, red; CHOS, green. The pie chart represents the distribution of these markers by hypothetical families of common wine compounds.

Once the markers were extracted and their nature assumed, it was possible to assign a hypothetical annotation (Level 3) to each of them using databases (KEGG, YMDB, Metlin, Lipidmap, Oligonet). In our case, only 10 to 15% of the specific markers could be

annotated in the databases, confirming previous conclusions that evoked the complexity of wine composition and the lack of knowledge on it in the current databases [3,17,43]. This step also allowed for the determination of the metabolic pathways associated with the metabolic modifications expressed by the specificity of the markers of each strain (Supplementary Figure S1.5). Thirty-two metabolic pathways were involved in exometabolome changes and include from 1 to 105 biomarkers. Among the most represented pathway, central metabolic pathways were found, such as carbon metabolism (67 biomarkers) or pyruvate metabolism (67 biomarkers). Moreover, there were also metabolic pathways involved in the synthesis of amino acids, such as phenylalanine (94 biomarkers). This last pathway is one of the many examples highlighting the importance of nitrogen metabolism, which appeared to be the most affected pathway. Indeed, most of the strain differentiation was associated with nitrogen-containing compounds. The significantly less intense biomarkers associated with the S2 strain, an adaptive evolution of the S1 strain, were predominantly nitrogen compounds, unlike S1. S1 was previously described by overexpression of genes coding amino-acid metabolism [31]. The adaptive evolution leading to the stimulation of the pentose phosphate pathway would therefore have fewer intermediate metabolites. This was confirmed by the absence of intermediate biomarkers of this metabolic pathway.

To confirm the structure of the previously annotated compounds, we performed an LC-MS/MS analysis and a comparison with the METLIN fragmentation database. A total of eight structures was confirmed (Level 2) (Supplementary Table S1.3) among the annotated masses.

The power of this approach made it possible to extract metabolites according to the strains used to conduct alcoholic fermentation. Thus, it was possible to determine the unique impact of each strain on the different types of metabolites and the related metabolic pathways. This also revealed intraspecific diversity through the non-volatile exometabolome. The non-targeted metabolomic approaches in the literature are mainly focused on secondary metabolism and therefore on the volatile exometabolome [43]. To our knowledge, this is the first time that a non-targeted approach focused on the main metabolism was conducted on a large panel of strains used in the wine industry.

Metabolic diversity was mainly observed at the level of nitrogenous metabolism, which plays a major role in the synthesis of volatile compounds. Therefore, it seemed important to investigate the intraspecific diversity on the secondary metabolism scale.

3.3. [Impact of Strains on the Volatilome](#)

HS-SPME-GC/MS was used to dose 35 volatile compounds in our fermentations. The volatile composition of each sample is presented in detail in Supplementary Table S4. A one-way ANOVA with strain as main effect was performed for each compound. The results showed that 31 compounds out of 35 showed significant differences between

yeast strains. The four compounds showing non-significant differences were nonanol, benzyl alcohol, nonanoic acid, and benzaldehyde. For our study, only the discriminant compounds were considered for further statistical analyses. The ester group was most represented, with 20 esters identified and quantified. PCA and HCA were applied to volatilome data and allowed for the differentiation of five groups of strains based on Euclidean distance and the Ward method (Figure 1.3).

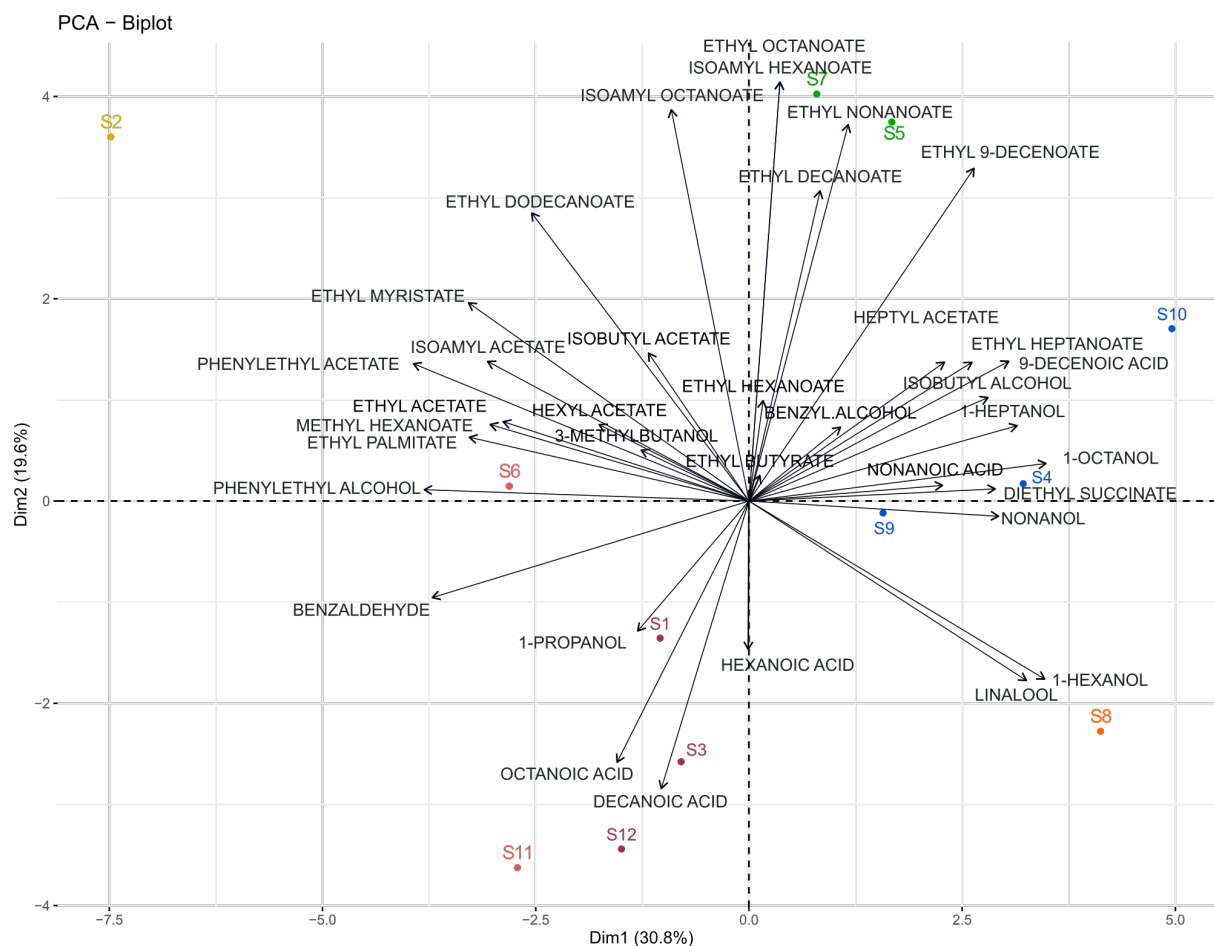


Figure 1.3: Biplot of PCA (Dim1 vs Dim2) analysis applied to significantly different volatile compounds found in the twelve fermentations carried out by the different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Colored samples represent different classes obtained from HCA.

The PCA score plot of the first two components explained 52.5% of the variation (Figure 1.3), with the first principal component (Dim1) accounting for 30.8% and the second (Dim2) accounting for 19.6%. The five clusters of samples from the HCA were projected onto this PCA using different colors.

The S8 and S2 strains appeared to form separate groups. The sluggish fermentation of S8 observed was also associated with a distinct volatilome and was in line with a contrasting metabolomic signature. This strain correlated with 1-hexanol and linalool. S2 is associated with isoamyl acetate, ethyl myristate, and phenylethyl acetate. On the other hand, other groups, like S5 and S7, were related to ethyl nonanoate and decanoate, while S1, S3, S6, and S12 were associated with three medium-chain fatty acids (MCFA)

(hexanoic, octanoic, and decanoic acids). Finally, S4, S9, and S10 were correlated with higher alcohols, such as 1-octanol and 1-heptanol.

Another representation made it possible to highlight that across our twelve strains, an overexpression of certain families of VOCs by some strains (Figure 1.4), in addition to the significant diversity of expression of volatile compounds, was observed. S5 and S7 overexpressed the same six esters, and S4 overexpressed mostly higher alcohols. S2 resulted from an adaptative evolution by orientation of the carbon flow towards the pentose phosphate pathway, overexpressing 8 of the 20 quantified esters, confirming previous studies [44,45].

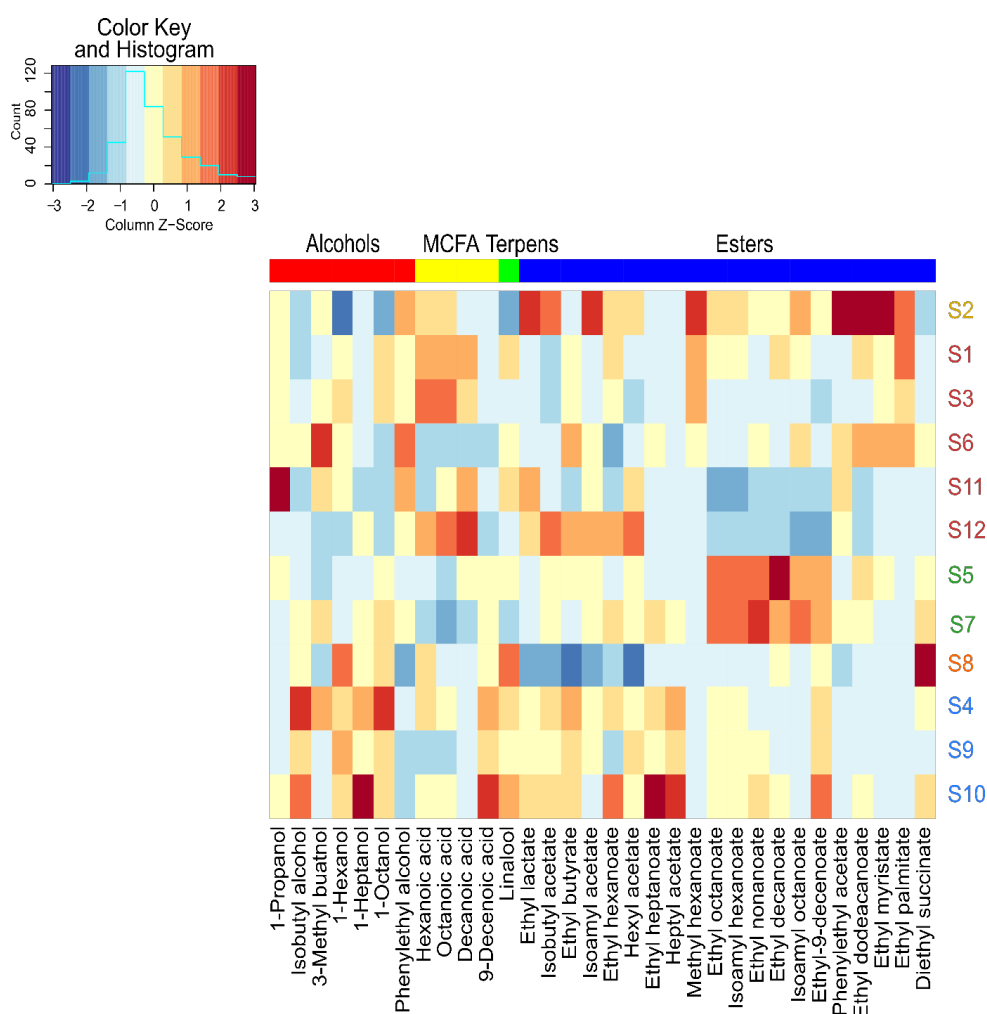


Figure 1.4: Heat map of volatile compounds produced by the different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Columns correspond to volatile compounds that presented significant differences between twelve strains. Colored samples represent different class obtained from HCA.

On the contrary, parental strain S1 predominantly overexpressed intermediates of these esters as MCFA. Indeed, Cadière *et al.*, 2012 [44] reported an increase in the concentration of some acetate esters by strain S2 evolved from parental strain S1. For example, the concentration was 2.5, 3.2, and 3.2 times higher for isoamyl acetate, isobutyl acetate, and phenylethyl acetate, respectively.

The initial composition of the matrix in nitrogenous sources [46], as well as the preferential nitrogenous sources [47], could lead to this modulation of the concentration of the volatile compounds according to the strain of *Saccharomyces cerevisiae* involved. Furthermore, this variety of production of these compounds is subject to the expression of several genes and variations in the expression level of several transcription factors [48–50]. Eder *et al.*, 2020 [51] also recently highlighted the involvement of loci and genes in nitrogen metabolism and its assimilation, influencing the formation of these volatile compounds, using the QTL mapping approach. This confirms the key role of nitrogen metabolism, the expression of related genes, and their regulation in the diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains at different scales. Our exometabolomic study underlined those differences in nitrogen metabolism and explained differences between strains, which supports previous findings using molecular approaches.

As described above, our results showed that it is possible to discriminate samples, thereby confirming intraspecific diversity in *Saccharomyces cerevisiae* species [43] and the considerable metabolic diversity of our strains. The latter reflected the intraspecific metabolic diversity observed during the study of the non-volatile exometabolome. Indeed, primary metabolism participates in the expression of secondary metabolism and thus in its diversity. However, these two approaches remain complementary. Chemical diversity was therefore observed from another angle. Indeed, FT-ICR-MS targeted a range of analyzed masses corresponding to the non-volatile metabolome of yeast. Furthermore, 35 volatile compounds were targeted for quantification, but this is not fully representative of the diversity of non-volatile compounds present in wines. Therefore, sensory analysis is still a valuable means of obtaining a comprehensive view of this intraspecific diversity.

3.4. [Sensory Impact of Intraspecific Diversity](#)

At the end of the alcoholic fermentation, the wines from the organic replicates of each yeast modality were pooled, sulfited, filtered, bottled, and stored for one month. Frequency citations of each attribute were computed for each sample.

The resulting contingency matrix was subjected to a correspondence analysis (CA), shown in Figure 1.5. The first two principal components of this CA, Dim1 and Dim2, explained 50.32% of the variance. The distribution of wine samples displayed a considerable separation between wines made with distinct yeast strains. Hierarchical cluster analysis (HCA) was carried out on wine coordinates on the two first dimensions of the CA. The samples were separated into three main groups, represented in various colors (Figure 1.5).

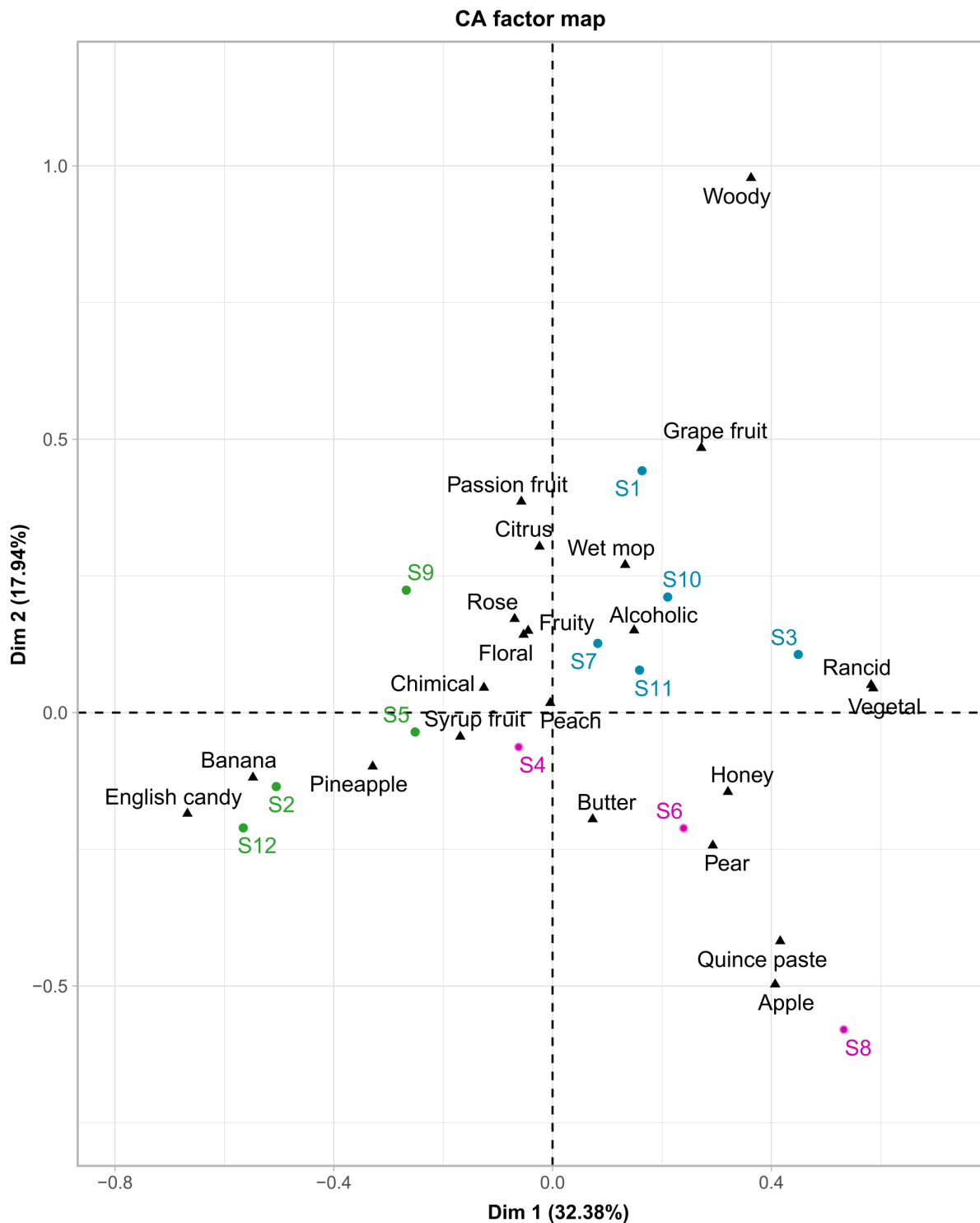


Figure 1.5: Biplot of the correspondence analysis of the general description of the twelve wines. Colors indicate the clusters obtained by HCA (using Ward's criterion) on the two first CA dimensions.

The first group (in blue), located in the positive values of the first dimension, included samples S1, S7, S10, S11, and S3, which can be described by the attributes: “grapefruit”, “wet mop”, “rancid”, “vegetal”. The second cluster (in green) was composed of wines from fermentations conducted with the S5, S9, S2, and S12 strains and were located on

the negative side of the first dimension. Within this cluster, S2 and S12 were characterized as “banana” and “English candy”, while S5 and S9 were “chemical” and “fruity”. The last group (in pink), composed of strains S4, S6, and S8, was characterized by oxidation terms as “quince paste”, “honey”, “butter”. Our results showed quite distinctive aroma profiles among the strains studied, demonstrating intraspecific diversity at the sensory level [52,53]. It was even possible to discriminate finished wines fermented by certain related strains. The S2 strain, resulting from the evolutionary adaptation of the S1 strain, belonged to different sensory classes, and hence, led to distinct sensorial profiles. Nevertheless, this was not the case for the S7 hybrid and the parental S10 strains. Despite the significant role of volatile compounds, their presence could not simply explain the sensory differences [54,55]. Moreover, despite a complex matrix, interactions between volatile compounds, and important differences in the perception threshold between the different aromatic volatile compounds, some descriptors could be related to volatile organic compounds. A high concentration of isoamyl acetate for strains S2 and S12 was significantly associated with very fruity terms, including “banana” and “English candy”, as mentioned in previous studies [44,56]. Concerning the vegetal term, we found a significant correlation with 1-hexanol, 1-heptanol, which has also been reported by other authors [57,58]. Moreover, 1-propanol was significantly linked to the term “rancid”, which had already been related to pungent flavors [20].

As for the two other approaches, it was possible to distinguish the finished wines produced thanks to the different strains of *Saccharomyces cerevisiae* used. The metabolic differences were, in fact, expressed in distinct phenotypes with regard to volatilome and sensory properties. We could see that the groups established based on the volatile composition analysis of the metabolome did not correspond exactly to the classes established from the sensory analysis. Furthermore, we observed that only a few sensory descriptors could be correlated to volatile compounds, as previously stated. Thus, this confirms previous studies, which revealed the difficulty of correlating the sensory aspect and the dosage of volatile compounds.

Synergetic phenomena were observed between volatile compounds [59]. Conversely, the masking of a volatile compound by another was demonstrated [57,60,61]. Thus, the interactions between volatile compounds lead to diverse aromatic profiles. Moreover, in this study, the dosage of volatile compounds remained non-exhaustive and therefore not representative of the aromatic profile of wine at the sensory level.

To our knowledge, this was the first time that these three complementary approaches were combined for a comparative study.

IV. Conclusions

This work reported the metabolic diversity within the *Saccharomyces cerevisiae* species under fermentative conditions from different perspectives. Ultra-high-resolution mass spectrometry (uHRMS) proved to be a powerful tool for the discrimination of yeast strains of the same species—in this case, *Saccharomyces cerevisiae*. A wide range of non-volatile metabolites belonging to different families of compounds, such as carbohydrates, peptides, lipids, aminosugars, polyphenols, and derivatives, was detected. Each of the strains could be associated with a specific metabolomic fingerprint, including unique markers and biomarkers that varied significantly in intensity. Thus, using this technique, we were able to highlight metabolic differences between strains of the same species that presented the same technological performances. Furthermore, the significant involvement of nitrogen metabolism in this differentiation was considered. It was also possible to show that the modulation of metabolism observed at the level of the non-volatile exometabolome was observed from the perspective of the volatilome and sensory aspect. Therefore, phenotypic differences within the same species revealed metabolic differences that resulted in the diversity of the volatile fraction that participates in the palette of the sensory pattern.

UHRMS analysis may be used for discriminating strains within yeast species after the alcoholic fermentation process and used in combination with other approaches to establish an integrative view of intraspecific diversity.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1.1: (A) Time series plot of the first principal component (t(1) vs. sample run order) (B) Plot representing the maximum, mean, and minimum peak intensity for each of the 9 QCs. (C) Histogram of all coefficients of variation values computed from the peak intensities from all the detected molecular compositions in the FT-ICR-MS data. (D) Extracted ion chromatograms of m/z 149.00917 in 9 sequential QCs samples., Table S1.1: Ballot used for the general odor description (translated from French), Table S2: Cell viability and fermentation parameters for the 12 strains of *Saccharomyces cerevisiae* (S1 to S12), Figure S1.2: Compounds common to all samples detected after methanol dilution. H/C vs O/C van Krevelen diagrams, histogram proportion showing their elemental compositions; H/C vs m/z van Krevelen diagrams combined with intensity vs m/z diagrams coupled to histograms proportions of the elemental formula compositions, and pie chart representing the distribution of these markers by hypothetical families of common wine compounds adapted from Rivas and Ubach et al., 2018 [23]. Bubble sizes indicate relative intensities of corresponding masses. Color code: CHO, blue; CHON, orange; CHONS, red; CHOS, green. Figure S1.3: Foot printing of twelve *Saccharomyces cerevisiae* strains based on FT-ICR-MS data using direct methanol dilution. ANOVA ($p < 0.05$) was used to extract specific markers for each of the twelve strains. For each strain, H/C vs O/C van Krevelen diagrams (B), histogram proportion (C) that show their elemental compositions and pie chart (D) representing the distribution of these markers by hypothetical families of common wine compounds adapted from Rivas and Ubach et al., 2018 [23]. Bubble sizes indicate relative intensities of corresponding masses. Color code: CHO, blue; CHON, orange; CHONS, red; CHOS, green., Figure S1.4: H/C vs m/z van Krevelen diagrams combined with intensity vs m/z diagrams coupled to histograms proportion of the elemental formula compositions exhibits specific strains markers significantly less and more intense in each fermentation. Bubble sizes indicate relative intensities of corresponding masses. Color code: CHO, blue; CHON, orange; CHONS, red; CHOS, green. The pie chart represents the distribution of these markers by hypothetical families of common wine compounds adapted from Rivas and Ubach et al., 2018 [23], Figure S1.5: Number of biomarkers that could be associated with the different metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* using MassTriX and Kegg, Table S1.3: Table of extracted, annotated, and identified metabolites according to wine fermented by each strain of *Saccharomyces cerevisiae* (S1 to S12). Levels of annotations were derived from Viant et al., 2017 [26], Table S1.4: Table of extracted, annotated, and identified metabolites according to wine fermented by each strain of *Saccharomyces cerevisiae* (S1 to S12). Levels of annotations were derived from Viant et al., 2017 [26]

Author Contributions : Conceptualization, F.B., C.R.-G., J.B., A.J.-O., and H.A.; methodology, F.B., C.R.-G., J.B., A.J.-O., P.S.K., and H.A.; validation, F.B., C.R.-G., A.J.-O., and H.A.; formal analysis, F.B., C.R.-G., and J.B.; investigation, F.B., S.V. and B.Q.-C.; resources, C.R.-G., J.B., S.V., B.Q.-C., R.D.G., A.J.-O., P.S.K., and H.A.; data curation, F.B.; writing—original draft preparation, F.B.; writing—review and editing, all authors.; visualization, F.B.; supervision, F.B., C.R.-G., A.J.-O., and H.A.; project administration, F.B., C.R.-G., A.J.-O., and H.A.; funding acquisition, F.B., C.R.-G., A.J.-O., and H.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work is a part of the METABOLOM (BG0022832.) project supported by the Conseil Régional de Bourgogne- Franche-Comté and the European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 programs.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank Rémy Romanet and Florian Bahut for their help in processing the data.

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

V. References

- Blow, N. Biochemistry's New Look. *Nature* **2008**, 455, 697–698, doi :10.1038/455697a.
- Vaclavik, L.; Lacina, O.; Hajslova, J.; Zweigenbaum, J. The Use of High Performance Liquid Chromatography–Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Coupled to Advanced Data Mining and Chemometric Tools for Discrimination and Classification of Red Wines According to Their Variety. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 685, 45–51, doi :10.1016/j.aca.2010.11.018.
- Roullier-Gall, C.; Witting, M.; Tziotis, D.; Ruf, A.; Gougeon, R.D.; Schmitt-Kopplin, P. Integrating Analytical Resolutions in Non-Targeted Wine Metabolomics. *Tetrahedron* **2015**, 71, 2983–2990, doi :10.1016/j.tet.2015.02.054.
- Gougeon, R.D.; Lucio, M.; Frommberger, M.; Peyron, D.; Chassagne, D.; Alexandre, H.; Feuillat, F.; Voilley, A.; Cayot, P.; Gebefugi, I.; et al. The Chemodiversity of Wines Can Reveal a Metabologeography Expression of Cooperage Oak Wood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 9174–9179, doi :10.1073/pnas.0901100106.
- Cuadros-Inostroza, A.; Giavalisco, P.; Hummel, J.; Eckardt, A.; Willmitzer, L.; Peña-Cortés, H. Discrimination of Wine Attributes by Metabolome Analysis. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 3573–3580, doi :10.1021/ac902678t.
- Castro, C.C.; Martins, R.C.; Teixeira, J.A.; Silva Ferreira, A.C. Application of a High-Throughput Process Analytical Technology Metabolomics Pipeline to Port Wine Forced Ageing Process. *Food Chem.* **2014**, 143, 384–391, doi :10.1016/j.foodchem.2013.07.138.
- Romanet, R.; Coelho, C.; Liu, Y.; Bahut, F.; Ballester, J.; Nikolantonaki, M.; Gougeon, R. The Antioxidant Potential of White Wines Relies on the Chemistry of Sulfur-Containing Compounds : An Optimized DPPH Assay. *Molecules* **2019**, 24, 1353, doi :10.3390/molecules24071353.
- Bahut, F.; Liu, Y.; Romanet, R.; Coelho, C.; Sieczkowski, N.; Alexandre, H.; Schmitt-Kopplin, P.; Nikolantonaki, M.; Gougeon, R.D. Metabolic Diversity Conveyed by the Process Leading to Glutathione Accumulation in Inactivated Dry Yeast : A Synthetic Media Study. *Food Res. Int.* **2019**, 123, 762–770, doi :10.1016/j.foodres.2019.06.008.
- Roullier-Gall, C.; Hemmler, D.; Gonsior, M.; Li, Y.; Nikolantonaki, M.; Aron, A.; Coelho, C.; Gougeon, R.D.; Schmitt-Kopplin, P. Sulfites and the Wine Metabolome. *Food Chem.* **2017**, 237, 106–113, doi :10.1016/j.foodchem.2017.05.039.
- Roullier-Gall, C.; Heinzmann, S.S.; Garcia, J.-P.; Schmitt-Kopplin, P.; Gougeon, R.D. Chemical Messages from an Ancient Buried Bottle : Metabolomics for Wine Archeochemistry. *npj Sci. Food* **2017**, 1, 1–7, doi :10.1038/s41538-017-0001-5.
- Van der Werf, M.J.; Overkamp, K.M.; Muilwijk, B.; Coulier, L.; Hankemeier, T. Microbial Metabolomics : Toward a Platform with Full Metabolome Coverage. *Anal. Biochem.* **2007**, 370, 17–25, doi :10.1016/j.ab.2007.07.022.
- Mashego, M.R.; Rumbold, K.; De Mey, M.; Vandamme, E.; Soetaert, W.; Heijnen, J.J. Microbial Metabolomics : Past, Present and Future Methodologies. *Biotechnol. Lett.* **2007**, 29, 1–16, doi :10.1007/s10529-006-9218-0.
- Pinu, F. Grape and Wine Metabolomics to Develop New Insights Using Untargeted and Targeted Approaches. *Fermentation* **2018**, 4, 92, doi :10.3390/fermentation4040092.
- Schmitt-Kopplin, P.; Hemmler, D.; Moritz, F.; Gougeon, R.D.; Lucio, M.; Meringer, M.; Müller, C.; Harir, M.; Hertkorn, N. Systems Chemical Analytics : Introduction to the Challenges of Chemical Complexity Analysis. *Faraday Discuss.* **2019**, 218, 9–28, doi :10.1039/C9FD00078J.
- Garcia, D.E.; Baidoo, E.E.; Benke, P.I.; Pingitore, F.; Tang, Y.J.; Villa, S.; Keasling, J.D. Separation and Mass Spectrometry in Microbial Metabolomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, 11, 233–239, doi :10.1016/j.mib.2008.04.002.
- Tang, J. Microbial Metabolomics. *Curr. Genom.* **2011**, 12, 391–403, doi :10.2174/138920211797248619.
- Roullier-Gall, C.; David, V.; Hemmler, D.; Schmitt-Kopplin, P.; Alexandre, H. Exploring Yeast Interactions through Metabolic Profiling. *Sci. Rep.* **2020**, 10, 6073, doi :10.1038/s41598-020-63182-6.
- López-Malo, M.; Querol, A.; Guillamon, J.M. Metabolomic Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the Cryotolerant Species *S. bayanus* Var. *Uvarum* and *S. kudriavzevii* during Wine Fermentation at Low Temperature. *PLoS ONE* **2013**, 8, e60135, doi :10.1371/journal.pone.0060135.
- Mendes, I.; Sanchez, I.; Franco-Duarte, R.; Camarasa, C.; Schuller, D.; Dequin, S.; Sousa, M.J. Integrating Transcriptomics and Metabolomics for the Analysis of the Aroma Profiles of *Saccharomyces cerevisiae* Strains from Diverse Origins. *BMC Genom.* **2017**, 18, 1–13, doi :10.1186/s12864-017-3816-1.
- Carrau, F.M.; Medina, K.; Farina, L.; Boido, E.; Henschke, P.A.; Dellacassa, E. Production of Fermentation Aroma Compounds by *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts : Effects of

- Yeast Assimilable Nitrogen on Two Model Strains. *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8*, 1196-1207, doi :10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x.
21. Eder, M.; Sanchez, I.; Brice, C.; Camarasa, C.; Legras, J.-L.; Dequin, S. QTL Mapping of Volatile Compound Production in *Saccharomyces cerevisiae* during Alcoholic Fermentation. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 166, doi :10.1186/s12864-018-4562-8.
 22. Longin, C.; Petitgonnet, C.; Guilloux-Benatier, M.; Rousseaux, S.; Alexandre, H. Application of Flow Cytometry to Wine Microorganisms. *Food Microbiol.* **2017**, *62*, 221-231, doi :10.1016/j.fm.2016.10.023.
 23. Gobert, A.; Tourdot-Maréchal, R.; Morge, C.; Sparrow, C.; Liu, Y.; Quintanilla-Casas, B.; Vichi, S.; Alexandre, H. Non-*Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences : Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2175, doi :10.3389/fmicb.2017.02175.
 24. Petitgonnet, C.; Klein, G.L.; Roullier-Gall, C.; Schmitt-Kopplin, P.; Quintanilla-Casas, B.; Vichi, S.; Julien-David, D.; Alexandre, H. Influence of Cell-Cell Contact between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* on Yeast Interactions and the Exo-Metabolome. *Food Microbiol.* **2019**, *83*, 122-133, doi :10.1016/j.fm.2019.05.005.
 25. Gougeon, R. D., Lucio, M., Frommberger, M., Peyron, D., Chassagne, D., Alexandre, H., Feuillat, F., Voilley, A., Cayot, P., Gebefugi, I., Hertkorn, N., & Schmitt-Kopplin, P. **2009**. The chemodiversity of wines can reveal a metaboledgeography expression of cooperage oak wood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(23), 9174-9179. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901100106>
 26. Viant, M.R.; Kurland, I.J.; Jones, M.R.; Dunn, W.B. How Close Are We to Complete Annotation of Metabolomes? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *36*, 64-69, doi :10.1016/j.cbpa.2017.01.001.
 27. Campo, E.; Ballester, J.; Langlois, J.; Dacremont, C.; Valentin, D. Comparison of Conventional Descriptive Analysis and a Citation Frequency-Based Descriptive Method for Odor Profiling: An Application to Burgundy Pinot Noir Wines. *Food Qual. Prefer.* **2010**, *21*, 44-55, doi :10.1016/j.foodqual.2009.08.001
 28. Ballester, J.; Abdi, H.; Langlois, J.; Peyron, D.; Valentin, D. The Odor of Colors : Can Wine Experts and Novices Distinguish the Odors of White, Red, and Rosé Wines? *Chem. Percept.* **2009**, *2*, 203-213, doi :10.1007/s12078-009-9058-0.
 29. Cadière, A.; Ortiz-Julien, A.; Camarasa, C.; Dequin, S. Evolutionary Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains with Increased in Vivo Flux through the Pentose Phosphate Pathway. *Metab. Eng.* **2011**, *13*, 263-271, doi :10.1016/j.ymben.2011.01.008.
 30. González-Ramos, D.; Muñoz, A.; Ortiz-Julien, A.; Palacios, A.T.; Heras, J.M.; González, R. A *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strain Overproducing Mannoproteins Selected through Classical Genetic Methods. *OENO One* **2010**, *44*, 243, doi :10.20870/oenone.2010.44.4.1475.
 31. Brice, C.; Sanchez, I.; Tesnière, C.; Blondin, B. Assessing the Mechanisms Responsible for Differences between Nitrogen Requirements of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts in Alcoholic Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 1330-1339, doi :10.1128/AEM.03856-13.
 32. Julien, A.; Roustan, J.-L.; Dulau, L.; Sablayrolles, J.-M. Comparison of Nitrogen and Oxygen Demands of Enological Yeasts : Technological Consequences. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 215.
 33. Barbosa, C.; Mendes-Faia, A.; Mendes-Ferreira, A. The Nitrogen Source Impacts Major Volatile Compounds Released by *Saccharomyces cerevisiae* during Alcoholic Fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *160*, 87-93, doi :10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.003.
 34. Edgardo, A.; Carolina, P.; Manuel, R.; Juanita, F.; Baeza, J. Selection of Thermotolerant Yeast Strains *Saccharomyces cerevisiae* for Bioethanol Production. *Enzym. Microb. Technol.* **2008**, *43*, 120-123, doi :10.1016/j.enzmictec.2008.02.007.
 35. Blanco, P.; Mirás-Avalos, J.M.; Pereira, E.; Fornos, D.; Orriols, I. « Modulation of Chemical and Sensory Characteristics of Red Wine from Mencía by Using Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains ». *OenoOne*. **2014**, *48*, 63, doi :10.20870/oenone.2014.48.1.1659
 36. Synos, K.; Reynolds, A.G.; Bowen, A.J. Effect of Yeast Strain on Aroma Compounds in Cabernet Franc Icewines. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *64*, 227-235, doi :10.1016/j.lwt.2015.05.044.
 37. Redzepovic, S.; Orlic, S.; Majdak, A.; Kozina, B.; Volschenk, H.; Viljoen-Bloom, M. Differential Malic Acid Degradation by Selected Strains of *Saccharomyces* during Alcoholic Fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *83*, 49-61, doi :10.1016/S0168-1605(02)00320-3.
 38. Rossouw, D.; Næs, T.; Bauer, F.F. Linking Gene Regulation and the Exo-Metabolome : A Comparative Transcriptomics Approach to Identify Genes That Impact on the Production of Volatile Aroma Compounds in Yeast. *BMC Genom.* **2008**, *9*, 530, doi :10.1186/1471-2164-9-530.
 39. Camarasa, C.; Sanchez, I.; Brial, P.; Bigey, F.; Dequin, S. Phenotypic Landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation : Evidence for Origin-Dependent Metabolic Traits. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25147, doi :10.1371/journal.pone.0025147.

40. Rivas-Ubach, A.; Liu, Y.; Bianchi, T.S.; Tolić, N.; Jansson, C.; Paša-Tolić, L. Moving beyond the van Krevelen Diagram : A New Stoichiometric Approach for Compound Classification in Organisms. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 6152–6160, doi :10.1021/acs.analchem.8b00529.
41. Ribéreau-Gayon, P. Observations related to the causes and consequences of stuck fermentation in vinification. *OENO One* **1999**, *33*, 39, doi :10.20870/oenone.1999.33.1.1041.
42. Alexandre, H.; Charpentier, C. Biochemical Aspects of Stuck and Sluggish Fermentation in Grape Must. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *20*, 20–27, doi :10.1038/sj.jim.2900442.
43. Viant, M.R.; Kurland, I.J.; Jones, M.R.; Dunn, W.B. How Close Are We to Complete Annotation of Metabolomes? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *36*, 64–69, doi :10.1016/j.cbpa.2017.01.001.
45. Borneman, A.R.; Desany, B.A.; Riches, D.; Affourtit, J.P.; Forgan, A.H.; Pretorius, I.S.; Egholm, M.; Chambers, P.J. Whole-Genome Comparison Reveals Novel Genetic Elements That Characterize the Genome of Industrial Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1001287, doi :10.1371/journal.pgen.1001287.
46. Roullier-Gall, C.; Witting, M.; Gougeon, R.D.; Schmitt-Kopplin, P. High Precision Mass Measurements for Wine Metabolomics. *Front. Chem.* **2014**, *2*, 102, doi :10.3389/fchem.2014.00102.
47. Alves, Z.; Melo, A.; Figueiredo, A.R.; Coimbra, M.A.; Gomes, A.C.; Rocha, S.M. Exploring the *Saccharomyces cerevisiae* Volatile Metabolome : Indigenous versus Commercial Strains. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143641, doi :10.1371/journal.pone.0143641.
48. Cadière, A.; Aguera, E.; Caillé, S.; Ortiz-Julien, A.; Dequin, S. Pilot-Scale Evaluation of the Enological Traits of a Novel, Aromatic Wine Yeast Strain Obtained by Adaptive Evolution. *Food Microbiol.* **2012**, *32*, 332–337, doi :10.1016/j.fm.2012.07.010.
49. Rollero, S.; Bloem, A.; Camarasa, C.; Sanchez, I.; Ortiz-Julien, A.; Sablayrolles, J.-M.; Dequin, S.; Mouret, J.-R. Combined Effects of Nutrients and Temperature on the Production of Fermentative Aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 2291–2304, doi :10.1007/s00253-014-6210-9.
50. Vilanova, M.; Ugliano, M.; Varela, C.; Siebert, T.; Pretorius, I.S.; Henschke, P.A. Assimilable Nitrogen Utilisation and Production of Volatile and Non-Volatile Compounds in Chemically Defined Medium by *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *77*, 145–157, doi :10.1007/s00253-007-1145-z.
51. Hazelwood, L.A.; Daran, J.-M.; van Maris, A.J.A.; Pronk, J.T.; Dickinson, J.R. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production : A Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 2259–2266, doi :10.1128/AEM.02625-07.
52. Verstrepen, K.J.; Derdelinckx, G.; Verachtert, H.; Delvaux, F.R. Yeast Flocculation : What Brewers Should Know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 197–205, doi :10.1007/s00253-002-1200-8.
53. Styger, G.; Prior, B.; Bauer, F.F. Wine Flavor and Aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 1145–1159, doi :10.1007/s10295-011-1018-4.
54. Rossouw, D.; Jacobson, D.; Bauer, F.F. Transcriptional Regulation and the Diversification of Metabolism in Wine Yeast Strains. *Genetics* **2012**, *190*, 251–261, doi :10.1534/genetics.111.132720.
55. Eder, M.; Nidelet, T.; Sanchez, I.; Camarasa, C.; Legras, J.-L.; Dequin, S. QTL Mapping of Modelled Metabolic Fluxes Reveals Gene Variants Impacting Yeast Central Carbon Metabolism. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2162, doi :10.1038/s41598-020-57857-3.
56. Blanco, P.; Mirás-Avalos, J.M.; Suárez, V.; Orriols, I. Inoculation of Treixadura Musts with Autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* Strains : Fermentative Performance and Influence on the Wine Characteristics. *Food Sci. Technol. Int.* **2013**, *19*, 177–186, doi :10.1177/1082013212442193.
57. Vararu, F.; Moreno-García, J.; Niculaua, M.; Cotea, V.V.; Mayén, M.; Moreno, J. Fermentative Volatilome Modulation of Muscat Ottonel Wines by Using Yeast Starter Cultures. *LWT* **2020**, *129*, 109575, doi :10.1016/j.lwt.2020.109575.
58. Tempère, S.; Marchal, A.; Barbe, J.-C.; Bely, M.; Masneuf-Pomarede, I.; Marullo, P.; Albertin, W. The Complexity of Wine : Clarifying the Role of Microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 3995–4007, doi :10.1007/s00253-018-8914-8.
59. Gammacurta, M.; Marchand, S.; Albertin, W.; Moine, V.; de Revel, G. Impact of Yeast Strain on Ester Levels and Fruity Aroma Persistence during Aging of Bordeaux Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 5378–5389, doi :10.1021/jf500707e.
60. Ferreira, V.; Fernández, P.; Peña, C.; Escudero, A.; Cacho, J.F. Investigation on the Role Played by Fermentation Esters in the Aroma of Young Spanish Wines by Multivariate Analysis. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *67*, 381–392, doi :10.1002/jsfa.2740670316.
61. Álvarez-Pérez, J.M.; Campo, E.; San-Juan, F.; Coque, J.J.R.; Ferreira, V.; Hernández-Orte, P. Sensory and Chemical Characterisation of the Aroma of Prieto Picudo Rosé Wines : The Differential Role of Autochthonous Yeast Strains on Aroma Profiles. *Food Chem.* **2012**, *133*, 284–292, doi :10.1016/j.foodchem.2012.01.024.
62. Callejon, R.M.; Clavijo, A.; Ortigueira, P.; Troncoso, A.M.; Paneque, P.; Morales, M.L. Volatile and

Sensory Profile of Organic Red Wines Produced by Different Selected Autochthonous and Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *660*, 68–75, doi :10.1016/j.aca.2009.09.040.

63. Grosch, W. Evaluation of the Key Odorants of Foods by Dilution Experiments, Aroma Models and Omission. *Chem. Senses* **2001**, *26*, 533–545, doi :10.1093/chemse/26.5.533.
64. Ferreira, V.; Lopez, R.; Cacho, J.F. Quantitative Determination of the Odorants of Young Red Wines from Different Grape Varieties. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1659–1667, doi :10.1002/1097-0010(20000901)80:11<1659::AID-JSFA693>3.0.CO;2-6.

VI. Supplementary data

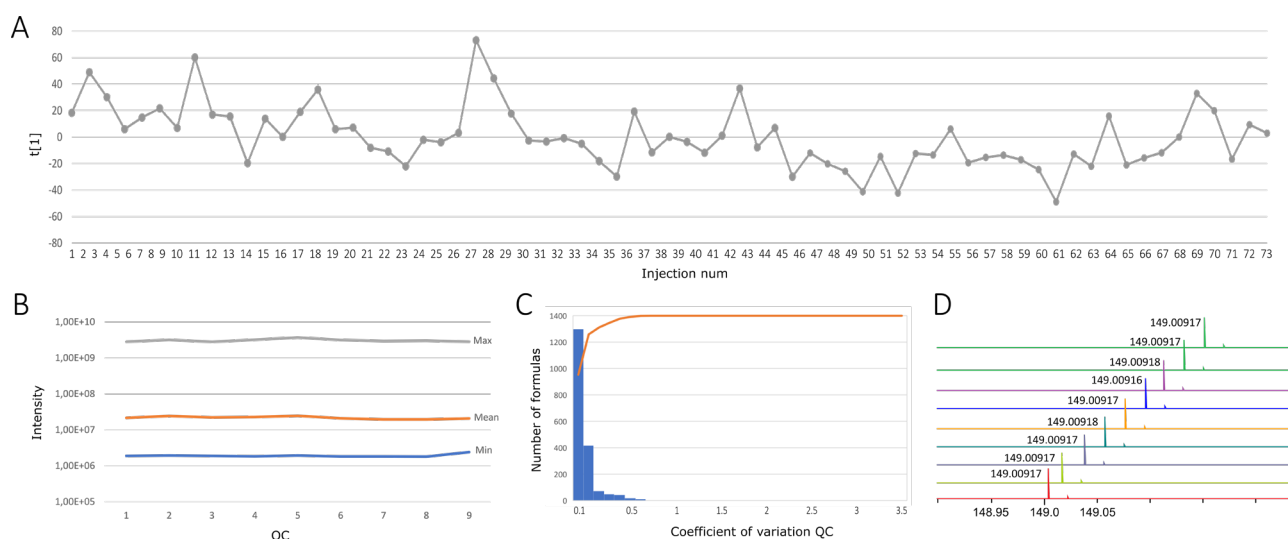


Figure S1.1 : (A) Time series plot of the first principal component ($t(1)$) vs. sample run order) (B) Plot representing the maximum, mean and minimum peak intensity for each of the 9 QCs. (C) Histogram of all coefficient of variation values computed from the peak intensities from all the detected molecular compositions in the FT-ICR-MS data. (D) Extracted ion chromatograms of m/z 149.00917 in 9 sequential QCs samples.

Table S1.1 : Ballot used for the general odor description (translated from French)

Sample :

Smell (only with your nose) each of the wines presented in front of you. Remember to note the sample code on each of the cards.

Check the descriptors that **best** correspond to the smell of each sample:

- | | | |
|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> Earthy | <input type="checkbox"/> Vanilla | <input type="checkbox"/> Wet mop |
| <input type="checkbox"/> Red fruits | <input type="checkbox"/> Floral | <input type="checkbox"/> Chemical |
| <input type="checkbox"/> Apple | <input type="checkbox"/> Vegetal | <input type="checkbox"/> Green Pepper |
| <input type="checkbox"/> Honey | <input type="checkbox"/> Rotten egg | <input type="checkbox"/> Fruit in syrup |
| <input type="checkbox"/> Alcoholic | <input type="checkbox"/> <u>Grape fruit</u> | <input type="checkbox"/> White flower |
| <input type="checkbox"/> Woody | <input type="checkbox"/> Pear | <input type="checkbox"/> Quince paste |
| <input type="checkbox"/> Fruity | <input type="checkbox"/> Toasted | <input type="checkbox"/> Banana |
| <input type="checkbox"/> English candy | <input type="checkbox"/> Spicy | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> Herbaceous | <input type="checkbox"/> Rancid | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> Citrus | <input type="checkbox"/> Peach | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> Rose | <input type="checkbox"/> Lemon | |
| <input type="checkbox"/> Petrol | <input type="checkbox"/> Pineapple | |
| <input type="checkbox"/> Butter | <input type="checkbox"/> Passion fruit | |

Table SI.2 : Cell viability and fermentation parameters for the 12 strains of *Saccharomyces cerevisiae* (S1 to S12)

Strains	Maximum population (viable cells/mL)	Time to dryness (hours)	Time to T50 (Hours)	Population decline before the end of fermentation	pH	Malic acid concentration (g/L)
S1	$1.06 \cdot 10^8$	216	67.5	–	3.91	4
S2	$1.18 \cdot 10^8$	168	60	YES (120 hours)	3.92	3.8
S3	$1.35 \cdot 10^8$	216	67.5	–	3.89	3.9
S4	$1.37 \cdot 10^8$	216	67.5	–	3.86	4
S5	$1.23 \cdot 10^8$	216	70	–	3.86	3.9
S6	$1.16 \cdot 10^8$	216	70	–	3.9	4.2
S7	$1.17 \cdot 10^8$	168	60	–	3.84	4.1
S8	$1.28 \cdot 10^8$	264	75	–	3.89	3.8
S9	$1.02 \cdot 10^8$	216	75	–	3.86	3.5
S10	$7.95 \cdot 10^7$	192	62.5	–	3.82	4.9
S11	$1.13 \cdot 10^8$	192	67.5	–	3.79	3.9
S12	$1.46 \cdot 10^8$	168	55	–	3.91	3.2

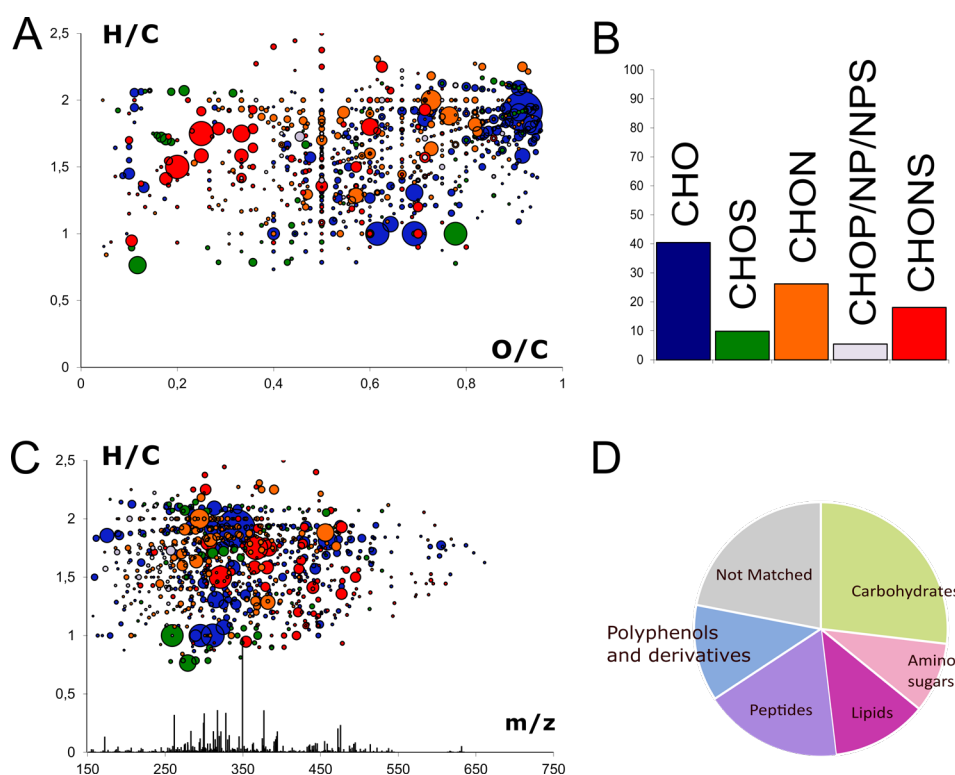
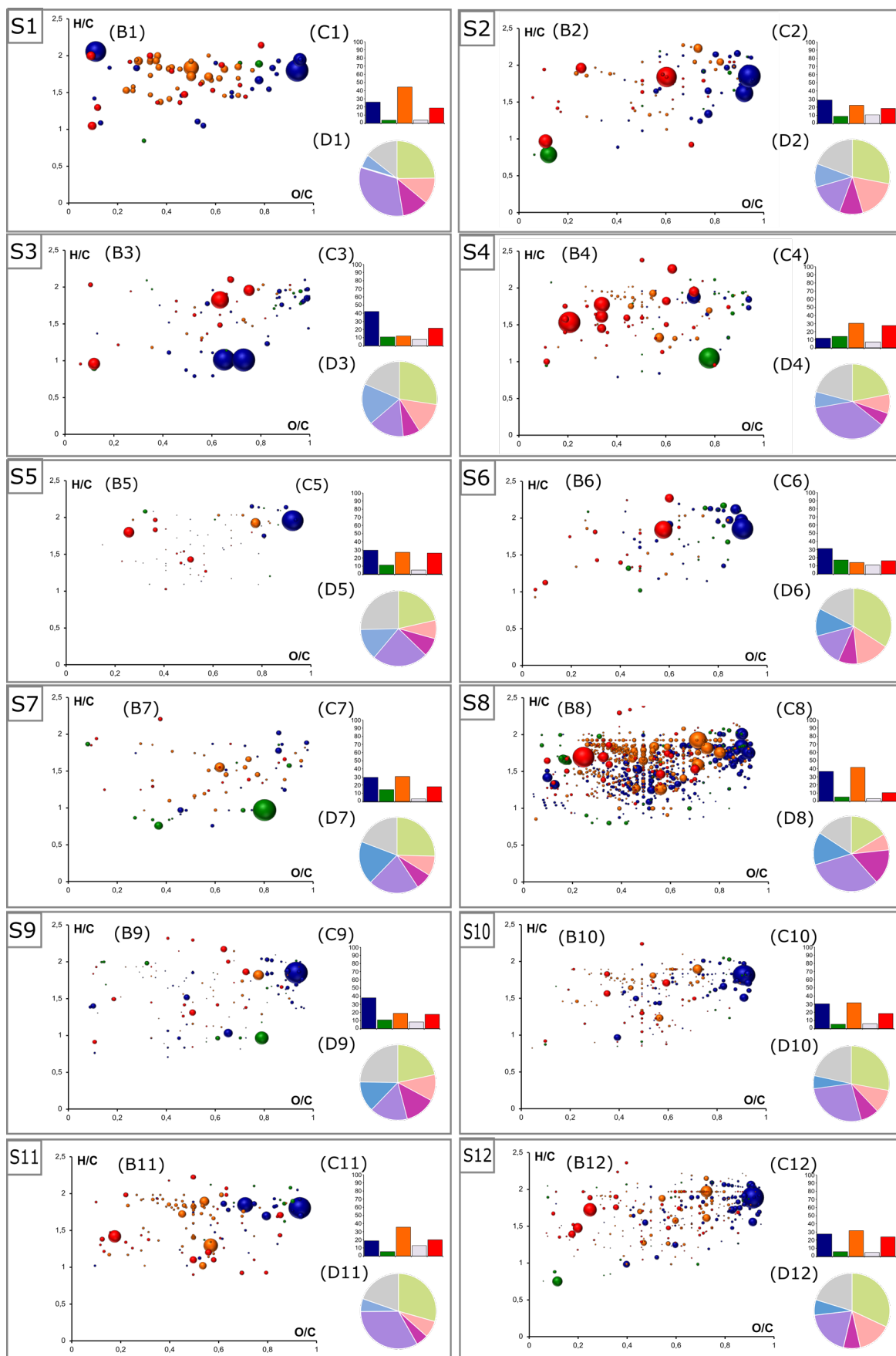


Figure SI.2 : Compounds common to all samples detected after methanol dilution. H/C vs O/C Van Krevelen diagrams. histogram proportion showing their elemental compositions. H/C vs m/z Van Krevelen diagrams combined with intensity vs m/z diagrams coupled to histograms proportions of the elemental formula compositions. and pie chart representing the distribution of these markers by hypothetical families of common wine compounds adapted from Rivas and Ubach et al.. 2018 [23]. Bubble sizes indicate relative intensities of corresponding masses. Colour code : CHO. blue; CHON. orange; CHONS. red; CHOS. green.



Van Krevelen masses composition (B and C) ◆ CHO ◆ CHONS ◆ CHOS ◆ CHON ◆ CHOP / CHONP / CHONPS

Predicted compound families (D) ■ Carbohydrates ■ Amino sugars ■ Lipids ■ Peptides ■ Polyphenols and derivatives ■ Not matched

Figure S1.3 : Footprinting of twelve *Saccharomyces cerevisiae* strains based on FT-ICR-MS data using direct methanol dilution. ANOVA ($p < 0.05$) was used to extract specific markers for each of the twelve strains. For each strain, H/C vs O/C Van Krevelen diagrams (B), histogram proportion (C) that show their elemental compositions and pie chart (D) representing the distribution of these markers by hypothetical families of common wine compounds adapted from Rivas and Ubach et al., 2018 [23]. Bubble sizes indicate relative intensities of corresponding masses. Color code : CHO, blue; CHON, orange; CHONS, red; CHOS, Green

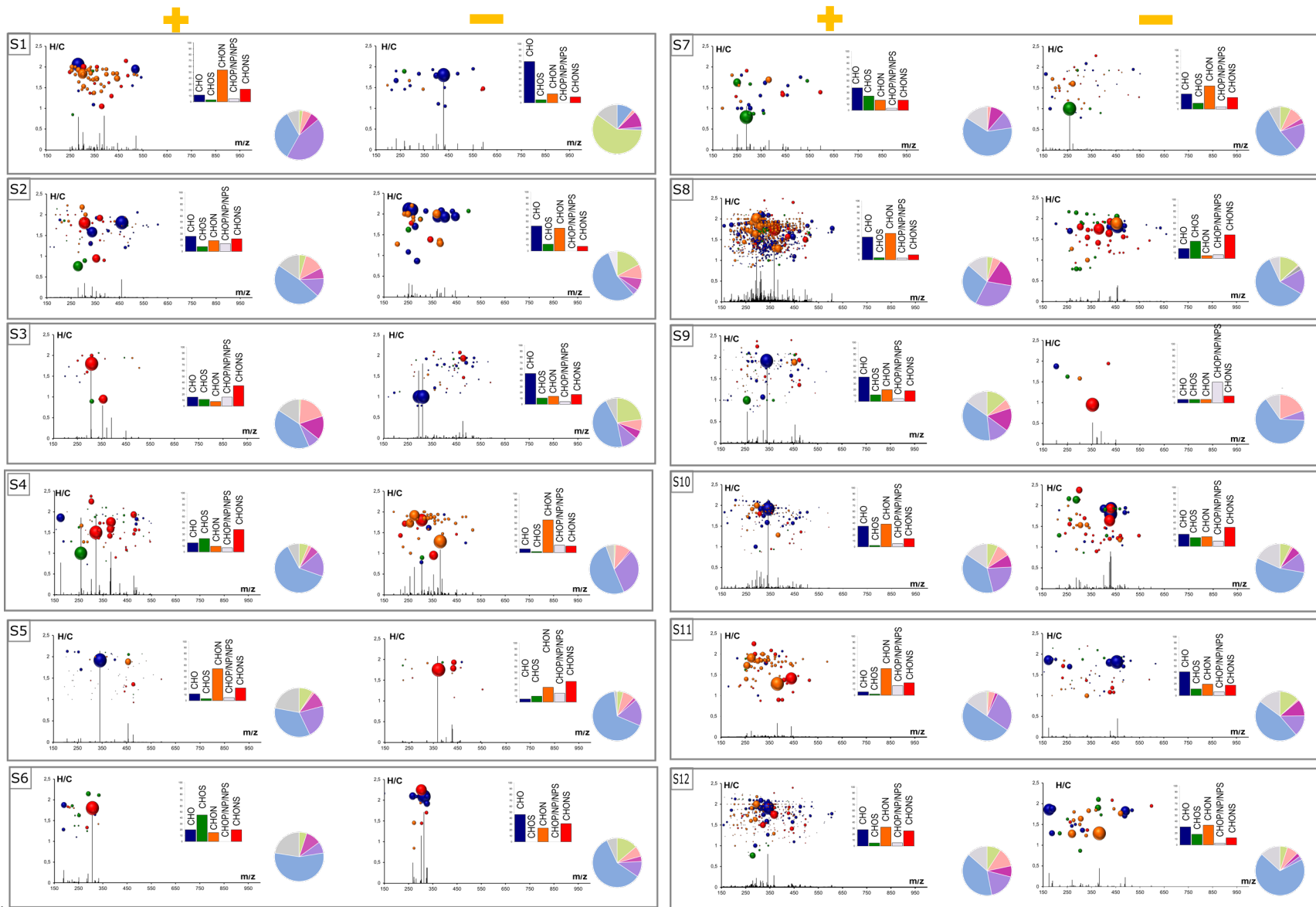


Figure S1.4 : H/C vs m/z Van Krevelen diagrams combined with intensity vs m/z diagrams coupled to histograms proportion of the elemental formula compositions exhibits specific strains markers significantly less and more intense in each fermentation. Bubble sizes indicate relative intensities of corresponding masses. Color code : CHO. blue; CHON. orange; CHONS. red; CHOS. green. The pie chart represents the distribution of these markers by hypothetical families of common wine compounds adapted from Rivas and Ubach et al., 2018 [23] .

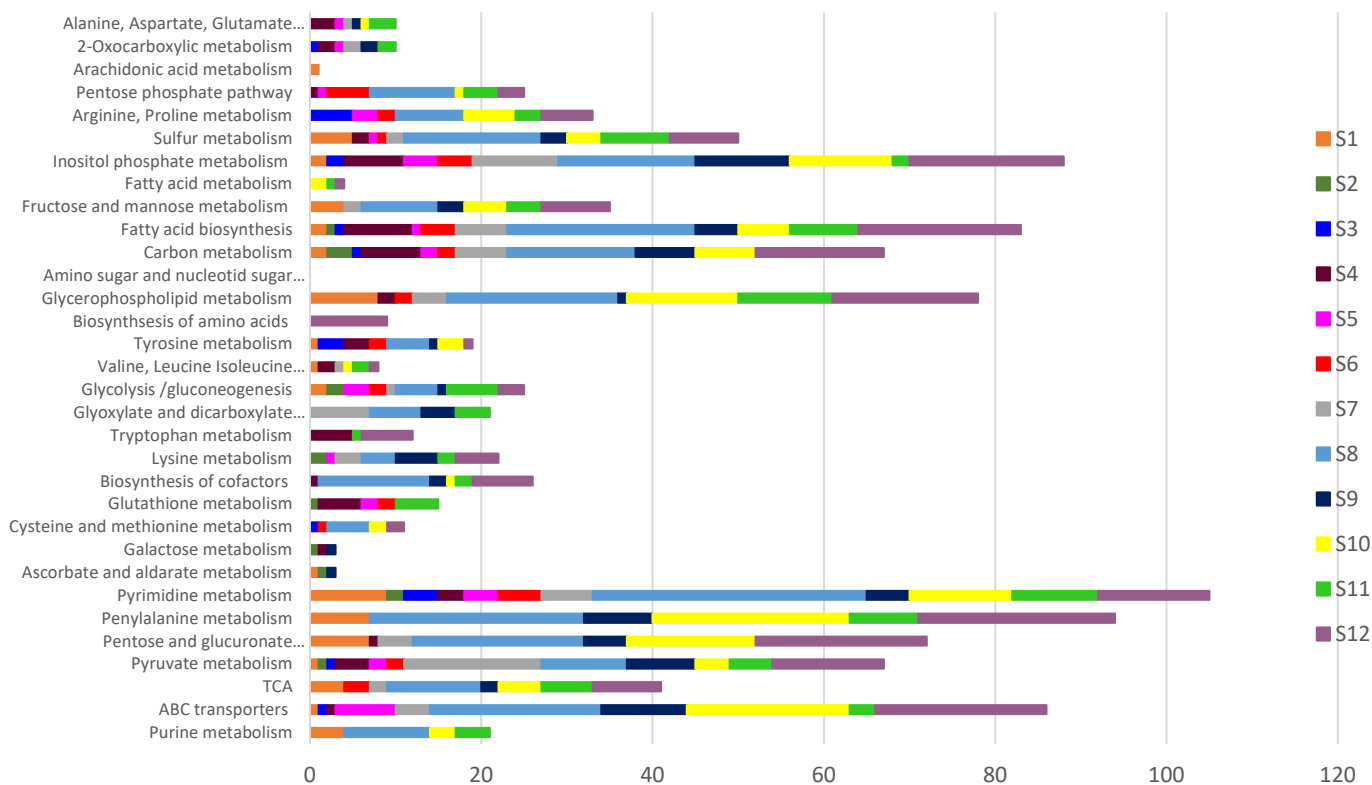


Figure S1.5 : Number of biomarkers that could be associated with the different metabolic pathways of Saccharomyces cerevisiae using MassTriX and Kegg

Table S1.3 : Table of extracted, annotated, and identified metabolites according to wine fermented by each strain of Saccharomyces cerevisiae (S1 to S12). Levels of annotations were derived from Viant et al., 2017 [26]

	Biomarkers	Annotated biomarkers	Biomarkers fragmented by MS/MS	Biomarkers annotated fragmented by MS/MS
S1	133	6	1	0
S2	208	16	5	1
S3	127	8	4	2
S4	289	15	3	0
S5	128	5	0	0
S6	165	7	5	0
S7	130	7	1	0
S8	1162	37	10	4
S9	222	17	3	1
S10	402	21	2	0
S11	309	15	0	0
S12	668	32	0	0

Conclusions Chapitre 1

Cette étude nous a permis d'appréhender sous différents angles, la diversité métabolique au sein de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* en conditions fermentaires et son impact sur le vin. La spectrométrie de masse à ultra-haute résolution (uHRMS) s'est avérée être un outil puissant pour la discrimination des souches de *S. cerevisiae*. Ainsi, grâce à cette technique, nous avons pu mettre en évidence des différences métaboliques entre des souches d'une même espèce présentant des performances technologiques similaires. De plus, l'implication significative du métabolisme de l'azote dans cette différenciation a été mise en lumière. Il a également été possible de montrer que la modulation du métabolisme observée au niveau de l'exométabolome non volatil était également observée du point de vue du volatilome et de la perspective sensorielle. Ainsi, les différences phénotypiques au sein de l'espèce *S. cerevisiae* ont révélé des différences métaboliques qui ont abouti à une importante diversité de la fraction volatile qui participe à celle du profil sensoriel des vins.

Cette première étude a donné lieu à la sélection de 4 souches présentant des empreintes métabolomiques et des profils aromatiques différents pour la suite des travaux dont l'objectif majeur est de décrire et appréhender les phénomènes d'interactions au cours de fermentations alcooliques conduites par une association de deux souches de *S. cerevisiae* en moût de Chardonnay.

CHAPITRE 2

IMPACT DE L'INTEGRATION D'UN GENE *EGFP* CHEZ *S. CEREVISIAE* : UNE APPROCHE METABOLOMIQUE

Contexte

L'étude des interactions entre micro-organismes au sein de systèmes tels que les co-cultures composées de deux populations ou encore de consortiums plus complexes, nécessite un suivi de la dynamique des populations en présence, parmi d'autres aspects d'étude. Diverses techniques culture dépendante faisant intervenir la distinction morphologique des colonies, la croissance sur milieu spécifique, sont couramment utilisées pour cette approche. Cependant, ces techniques sont souvent laborieuses, en raison de leur temps d'exécution, de la variabilité d'exécution et de l'introduction de biais, de la cultivabilité des micro-organismes présents mais aussi du délai d'obtention de résultats. La cytométrie en flux apparaît comme un outil de choix pour la rapidité d'analyse et sa possibilité d'analyse en temps réel. Cette technique d'analyse puissante permet de détecter et de caractériser rapidement une cellule au sein des écosystèmes (Diaz *et al.*, 2010 ; Longin *et al.*, 2017). Pour appliquer cette technique à des études de consortium de micro-organismes ou de co-cultures modèles, il est nécessaire de pouvoir discriminer les sous-populations. Toutefois, deux souches d'une même espèce de levure ont des paramètres physiologiques de taille et de granularité (ou propriétés optiques) similaires rendant leur discrimination difficile à partir de ces deux paramètres. Dans le cas de la levure, le marquage fluorescent ou le traçage cellulaire a déjà été utilisé pour suivre un système multidimensionnel (Conacher *et al.*, 2020; Lorang *et al.*, 2001; Petitgonnet *et al.*, 2019; Tatchell & Robinson, 2002). La discrimination des sous-populations devient alors possible par l'analyse et la quantification de la fluorescence.

Ainsi, pour pouvoir suivre cette dynamique de population, une des quatre souches sélectionnées, la souche S3, a été modifiée génétiquement en intégrant un gène codant une protéine fluorescente eGFP au sein du gène *HO*. Une expérimentation visant à déterminer l'impact de cette intégration dans le génome sur le phénotype et le métabolisme levurien a fait l'objet d'une étude, développée dans ce chapitre sous la forme d'un article scientifique publié dans le journal *Microorganisms* en Février 2022.

Article

***eGFP* gene integration in *HO* : a metabolomic impact?**

Fanny Bordet^{*1,2}, Rémy Romanet¹, Camille Eicher¹, Cosette Grandvalet¹, Géraldine Klein¹, Régis Gougeon^{1,3}, Anne Julien-Ortiz², Chloé Roullier-Gall¹, Hervé Alexandre¹

¹Université Bourgogne Franche-Comté, Institut Agro Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France- Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (IUVV), Rue Claude Ladrey, BP 27877, CEDEX, bordet.fanny@gmail.com (F.B.); remy.romanet@u-bourgogne.fr (R.R.), camille.eicher@gmail.com (C.E.), Chloé.Roullier-Gall@u-bourgogne.fr (C.R.- G.), regis.gougeon@u-bourgogne.fr (R.G.);rvalex@u-bourgogne.fr (H.A.)

² Lallemand SAS, 19 Rue des Briquetiers, CEDEX, 31700 Blagnac, France, ajulien@lallemand.com (A.J.-O.)

³DIVVA (Développement Innovation Vigne Vin Aliments) Platform/PAM UMR, IUVV, Rue Claude Ladrey, BP 27877, CEDEX, 21078 Dijon, France

* Correspondence: bordet.fanny@gmail.com

Abstract : Integrating fluorescent genes including *eGFP* in the yeast genome is common practice for various applications, including cell visualization and population monitoring. The transformation of a commercial *S. cerevisiae* strain by integrating a gene encoding an EGFP protein in the *HO* gene was carried out using CRISPR-Cas9 technology. Although this type of integration is often used and described as neutral at the phenotypic level for the cell, we have highlighted that under alcoholic fermentation (in Chardonnay must) it has an impact on the exometabolome. We observed 41 and 82 unique biomarkers for the S3 and S3GFP strains, respectively, as well as 28 biomarkers whose concentrations varied significantly between the wild type and the modified strains. These biomarkers were mainly found to correspond to peptides. Despite similar phenotypic growth and fermentation parameters, high resolution mass spectrometry allowed us to demonstrate for the first time that the peptidome is modified when integrating this cassette in the *HO* gene.

Keywords : *S. cerevisiae*; *eGFP*; *HO* gene; CRISPR-Cas9 technology; metabolomics

I. Introduction

Fluorescent labeling or cell tracing has previously been used extensively to track a multi-dimensional system [1-5]. The discrimination of subpopulations is then possible by fluorescence analysis and quantification. Different fluorescent proteins for the fluorescent tagging of *Saccharomyces cerevisiae* are used to perform cell dynamics measurements in culture. The Green Fluorescent Protein (GFP), discovered in 1962 by Shimomura [6] and derived from the jellyfish *Aequorea victoria*, is currently the best known. This protein is composed of 11 Beta-sheets and an α -helix including the chromophore and loops between the sheets. It undergoes cyclization and is then oxidized to form the chromophore p-hydroxybenzylidene-imidazolidinone which will become mature after a cycle of protonation-deprotonation. This EGFP protein initially showed two absorption wavelengths at 395 and 477 nm and an emission peak at 509 nm. Different variants of this protein have been developed including the EGFPs65T protein, making it possible to simplify the absorption spectrum and reduce

chromophore formation time [7,8]. The use of this protein has different applications such as the use of the gene coding it as a reporter gene, and the protein as a molecular or cellular marker [9].

The selection of the target gene for *eGFP* gene integration remains crucial. Thus, the *HO* gene of the yeast *S. cerevisiae*, which is responsible for the diploidization of haploid cells, has proven to be a tool of choice. Indeed, this gene, which codes for an endonuclease, configures the mating type and thus initiates transposition between the a and α types of haploid cells [10–12], is inactive in diploid cells. Since most oenological yeasts are diploid, there is no transcription of this gene due to the inhibition of the gene by the $a1$ and $\alpha2$ products. Therefore, the inactivation of this gene by the integration of a gene coding for a cell marking protein such as EGFP should not impact the cell phenotype.

However, in all studies focusing on the monitoring of cell dynamics, it is essential to confirm the absence of impact of this integration in order to exhaustively evaluate the behavior of the subpopulations present. Few phenotypic changes contributing to the common use of tagged yeast have been observed or reported. In 1994, Chalfie *et al.* reported that cells grew normally even in the presence of the gene coding for EGFP and suggested that EGFP was a good candidate for cell separation with fluorescently activated cells. They also considered that EGFP could be used as a vital marker to assess cell growth [13]. Nevertheless, some studies have noted changes, including protein localization. Furthermore, it was found that when EGFP was used as a fusion protein, depending on the target protein, the localization of the labeling (N- or C-end tagging) could induce changes in the expression of *EGFP*, including the localization of fluorophore expression [14]. These results were confirmed by targeting proteins essential for yeast growth. Thus, the authors were able to demonstrate that in some cases this modification of the subcellular localization of protein expression was associated with a modification of cell fitness [15].

Most studies focus on the phenotypic impact and certain metabolic features of the integration of genes coding for an EGFP, but few have focused on the impact on the overall metabolism of the cell. In this study, different approaches were combined to determine the impact at different scales of the integration of an *eGFP* gene into the *HO* gene of a commercial diploid *S. cerevisiae* strain. The metabolomic approach was employed, for the first time, to characterize the effect of this transformation.

II. Materials and Methods

2.1. Microbial strains

The *Saccharomyces cerevisiae* parental strain used in the *eGFP* integration by the CRISPR-Cas9 system was a commercial strain coded S3 (Lallemand Inc, Montreal, Canada). *E. coli* DH5 α was used as plasmid vector for S3GFP construction. S3 and *E. coli* DH5 α were stored at -80°C, respectively, in YPD liquid medium (0.5% (w/v) yeast extract (Biokar, Beauvais, France), 1% (w/v) bactopectone (Biokar), 2% (w/v) D-glucose (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France), and 0.02% (w/v) chloramphenicol (Sigma, Saint-Louis, MI, USA) containing 20% v/v glycerol and LB liquid medium (0.5% (w/v) yeast extract (Biokar, Beauvais, France), 1% (w/v) bactopectone (Biokar), 1% (w/v) NaCl (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)) containing 20% v/v glycerol.

2.2. Constructions of yeast strains labeled with EGFP using CRISPR-Cas9 tool

EGFP *S. cerevisiae* strains were constructed using the CRISPR-Cas9 tool (Figure S1) carrying the pCE vector derived from the pRCC-K vector [16]. sgRNA was designed to target the *S. cerevisiae* *HO* gene using gRNA designer (ATUM) (Table 2.1). The plasmid pCE was constructed by inserting the gRNA-oligotarget1-*HO* downstream from the SNR52 promoter by digesting pRCC-K with BamHI and using the NEBuilder HiFi DNA assembly Cloning kit (New England Biolabs, Ipswich, USA) according to the manufacturer's recommendations. *E. coli* DH5 α recombinant strains were selected on LB plates supplemented with ampicilin (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). The insertion of sgRNA in pRCC-K was checked by plasmid DNA extraction using NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Germany), then Sanger sequencing of the insertion-region by Genewiz® (Leipzig, Germany) using the primer V1-AS-F (Table 2.1).

A donor DNA fragment containing the *eGFP* gene and the Nourseothricin resistance cassette was amplified from the pFA6a-TEF2Pr-*eGFP*-ADH1-NATMX4 plasmid [17] using primers (Fluo-F-HO and Fluo-R-HO, Table 2.1) and Taq polymerase (ROCHE) according to the manufacturer's instructions. Both primers contained floating tails in 5' corresponding to the insertion sequence of the *HO* gene, enabling homolog recombination in the *S. cerevisiae* S3 genome.

The LiAc transformation method was used to transfer pCE and donor DNA fragment into *S. cerevisiae*. Yeast competent cells were prepared as follows: *S. cerevisiae* cells were grown in YPD medium at 28°C under shaking until reaching optical density at 600nm (OD600nm) of 2. Cells (100 UDO) were harvested by centrifugation (3730 \times g for 5 min at room temperature (RT)) and washed in 10 mM Tris pH 7.5. Yeasts were centrifuged for 3730 \times g 5 min at RT and resuspended in LiAc Buffer (0.1 M lithium

acetate, 10mM Tris, pH 7.5) and incubated for 40 min at 20°C. Competent yeast cells were centrifuged at 2000 × g for 5 min at RT and resuspended in 2.25 ml of LiAc Buffer.

pCE plasmid (500 ng), *eGFP*-Nourseothricin fragment (1 µg) and Salmon testes ssDNA (1 g, Sigma) were mixed with the competent cells (final volume 100 µl) and incubated for 10 min at 20°C without agitation. Then 300 µl of 50% PEG 4000 was added before incubating 10 additional min at 20°C. Yeast cells were then heat-shocked at 42°C for 15 min. PEG was removed by centrifugation (2000 × g for 4 min at RT) and transformed cells were resuspended in 500 µl YPD and incubated at 30°C overnight with gentle shaking. *S. cerevisiae* recombinant strains were selected on YPD plates supplemented with Nourseothricin (75 µg.ml⁻¹, Sigma). Homologous recombination was verified by PCR amplification on yeast recombinant strains as follow. Chromosomal DNA was extracted from yeast colonies using the InstaGene™ Matrix kit (Bio Rad, Hercules, USA) and DNA was amplified using GoTaq® DNA polymerase (Promega) according to the manufacturer's instructions. The *eGFP*-Nourseothricin fragment was amplified using primers Verif*GFP*-F and Verif*GFP*-R (Table 2.1) and recombination into the *HO* gene was checked using primers V1*HO*-F V2*HO*-R and V1*HO*-F Verif*GFP*-R (Table 2.1).

Table 2.1: Primers used in this study. sgRNA sequences targeting the HO gene have been underlined for gRNA-oligotarget1-HO. Floating tails of Fluo-F-HO and Flu-R-HO primers enabling recombination have been underlined.

Primer	Sequence (5'-3')*
gRNA-oligotarget1-HO	CTCCGCAGTGAAAGATAAATGATCAAATTGGGCATTACGCCCGA GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGG
V1-AS-F	GTAGTGCCCTCTTGGGCTA
Fluo-F-HO	<u>AAAAAGGCAAAAAGACAAAGGCGAAAAATTGGGCATTACGCCCGGTCGACGGATCCCCGGGTT</u>
Fluo-R-HO	<u>CACATTTTATACACTCTGGTCCTTTAACTGGCAAACCTTCGTCGATGAATTTCGAGCTCGTT</u>
Verif<i>GFP</i>-F	ACGGCGTCGTACAAGAGAAC
Verif<i>GFP</i>-R	TACATAACCTTCGGGCATGG
V1<i>HO</i>-F	CATACGACTGTAATGTTGCT
V2-<i>HO</i>-R	AACTGTAAGATTCCGCCAC

*sgRNA sequences targeting the *HO* gene have been underlined for gRNA-oligotarget1-*HO*. Floating tails of Fluo-F-*HO* and Flu-R-*HO* primers enabling recombination have been underlined.

2.3. Fermentation process

Yeast strains were grown on YPD plates (YPD broth with 2% w/v agar) at 28°C from the stock at -80°C. From each YPD plate, one isolated colony was inoculated in 15 ml of YPD medium, and the liquid cultures were incubated at 28°C for 24 h. These precultures were diluted at a concentration of 0.1% (v/v) in 150 ml of YPD medium (0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) bactopectone, 2% (w/v) glucose, and 0.02% (w/v) chloramphenicol) in 250 ml Erlenmeyer flasks. After incubation at 28°C with stirring (150 rpm) for 18 h, a second culture in filtered Chardonnay must (0.22 µm membrane, ClearLine, Dutscher, Dumath, France) was performed in 150 ml in 250 ml Erlenmeyer flasks at 28°C in static mode for 18 h. These cultures were used to inoculate pasteurized Chardonnay must containing 226.6 g.l⁻¹ glucose/fructose, pH 3.92, and 343.1 g.l⁻¹ total assimilable nitrogen,

at 1×10^6 viable cells. ml^{-1} . The fermentations were performed in 2l bottles containing 1 l of inoculated must covered with sterile cotton wool. For each strain, assays were conducted in three biological replicates at 20°C without stirring. The end of fermentation was considered as the total depletion of sugars.

2.4. [Flow cytometry analysis](#)

2.4.1. [Yeast viability](#)

Yeast viability in preculture and during fermentation was determined by flow cytometry. The fluorochrome used was Propidium Iodide (PI) (Invitrogen, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, Illkrich, France) dissolved in filtered milliQ water at a concentration of 0.1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ [4]. One μl of PI was added to 100 μl of diluted yeast suspension in PBS buffer (ThermoFisher Scientific, Illkrich, France). Samples were incubated in the dark 15 min before measurement.

2.4.2. [Flow cytometry settings](#)

Flow cytometry was performed with a BD Accuri C6 flow cytometer and the resulting data were processed using the BD Accuri C6 software. A 488-nm wavelength argon laser was used to excite the cells (autofluorescence) and dye.

For each sample, 20 μl of each sample was analyzed at 34 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$. The FSH-threshold used was 80,000. PI and GFP fluorescence were measured on the FL3-H long pass filter (675 nm) and on the FL1-H channel (533/530 nm), respectively. The fluorescence intensity of the relevant channel was plotted as Side SCatter light (SSC) and analyzed. Cell viability was determined by subtracting the PI-labeled dead population from the total population. Gates were drawn to delimit the wild type and fluorescent yeast populations. Daily sampling of samples was carried out.

2.5. [Two photon microscopy](#)

Two-photon imaging microscopy was performed to achieve 2D representations of the two *Saccharomyces cerevisiae* strains. The images were collected on a Nikon A1-MP scanning microscope equipped with a Plan APO IR $\times 60$ objective (NA, 1.27; Water Immersion, Nikon, Tokyo, Japan) at a scanning speed of one frame per second. An IR laser (Chameleon, Coherent, Palo Alto, CA, USA) was used to provide excitation at 820 nm. Fluorescence emission was collected on two detection channels: FF01-492/SP (400–492 nm) and FF03-525/50 (500–550 nm) (Semrock, New York, USA). The images provided in this article were obtained by merging these two detection channels.

Samples of culture were collected and centrifuged at $8,000 \times g$ for 5 min at 20°C. The culture supernatant was removed, and the pellet resuspended in PBS buffer (137 mM

NaCl, 2.7 mM KCl, and 11.9 mM Phosphate, pH 7.2) (ThermoFisher Scientific, Illkrich, France). Five microliters of cell suspension were placed between a glass slide and a coverslip for observation.

2.6. [Analytical method](#)

2.6.1. [Enological analysis](#)

To determine the sugar concentration and ethanol degree, the samples were centrifuged at $8,000 \times g$ for 5 min at 4°C and were monitored daily by FTIR (Fourier Transformed InfraRed) spectroscopy (OenoFOSS™, FOSS, Hilleroed, Denmark). Daily sampling of all the samples was carried out.

2.6.2. [UHPLC-Q-ToF-MS analysis](#)

Analyses were performed using ultra-high-pressure liquid chromatography (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) coupled with a MaXis plus MQ ESI-Q-ToF mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany). Non-polar compounds were analyzed in reverse phase using Acquity BEH C18 1.7 % m, 100×2.1 mm column (Waters, Guyancourt, France). The mobile phase was ultrapure water from a Milli-Q system (Merck, Darmstadt, Germany) + 0.1% (v/v) of formic acid (MS grade) from (Acros Organic, Morris Plains, NJ, USA) for eluent A, and 95% (v/v) acetonitrile (MS grade) (Biosolve, Dieuze, France) + 0.1 (v/v) of formic acid for eluent B. The temperature of elution was 40°C using the gradient: 0-1.10 min 5% (v/v) of eluent B and 95% of eluent B at 6.40 min. The flow was $400 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. The nebulizer pressure was 2 bar and $10 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ for the nitrogen dry gas flow. Ionization was performed in electrospray in positive or negative ion mode. The ion transfer parameters were 500 V for the end plate offset and 4500 V for the capillary voltage. Before each batch analysis, the mass spectrometer was calibrated using undiluted Tuning Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) in enhanced quadratic mode (errors <0.5 ppm). The mass range was between 100 and $1000 m/z$. To verify the stability of the UHPLC-Q-TOF-MS system, quality controls (mix of all the samples analyzed in the batch analysis) were analyzed at the beginning, the end and every 10 samples during the batch analysis. All the samples were analyzed randomly. The injection of the calibrant ESI-L Low concentration Tuning Mix diluted 4 times at the beginning of each run allowed recalibrating the spectrum.

DataAnalysis (v. 4,3, Bruker, Mannheim, Germany) was used for the internal mass recalibration of the spectrum and extraction of molecular features (couple m/z , retention time). Spectral background noise was removed before feature extraction ($S/N > 30$, absolute intensity >1000). A homemade R script was used for feature alignment with m/z and a retention time tolerance lower than 10 ppm and 0.3 min, respectively. Matlab (R2015a) was used for statistical analysis (PCA, t-test) and data visualization. Isolated significant features were annotated using the online database Metlin, KEGG

and Oligonet online tools (*KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, s. d.; *Metlin*, s. d.; Y. Liu et al., 2017). Van Krevelen plots were produced using the elementary formula obtain by annotation.

III. Results and discussion

3.7. Fluorescence emission of recombinant yeast GFP

The *S. cerevisiae* commercial strain coded S3 was genetically modified by integrating the *eGFP* gene into the chromosomal *HO* gene using the CRISPR-Cas9 tool. The correct integration of *eGFP* into both *HO* alleles of the S3 diploid strain has been checked by PCR amplifications using three couple of primers (Table 2.1) as described in Material and methods (data not shown).

Two-photon microscopy was used to confirm the expression of the *eGFP* gene in *Saccharomyces cerevisiae* and visualize EGFP localization in cells (Figure 1). We observed considerable homogeneity of the intensity and distribution of the fluorescence emitted by the cells throughout the sample. The images presented above are, therefore, representative of each of the samples studied. The wild-type strains (Figure 1(B1,B2)) exhibited a green auto-fluorescence, which could coincide with intracellular compartments, such as the vacuole or nuclei, as previously described [21-23]. Thus, a blue fluorescence was detected on another channel (Figure 1(A3,B3)) when observing the samples corresponding to both the wild-type strain and the modified strain. This signal seemed to be emitted at the region of the cell wall and was more intense at the bud junctions and budding scars. We could also observe a considerable difference in green fluorescence emissions between modified (Figure 1(A1,A2)) and wild-type cells (Figure 1(B1,B2)). Indeed, the auto-fluorescence emitted by the wild-type strain appeared to be less intense than for the modified strain. This confirmed the correct integration of the gene coding for the EGFP protein, as confirmed by the verification PCR (data not shown) as well as the production of the chromophore in its mature form. The latter did not appear to be localized in a defined cellular compartment. The fluorescence was diffused throughout the cell as expected. Therefore, the protein was apparently expressed in the cytoplasm. The use of two-photon microscopy allowed us to confirm that the fluorescence observed was inside the cell and not only localized at the yeast walls.

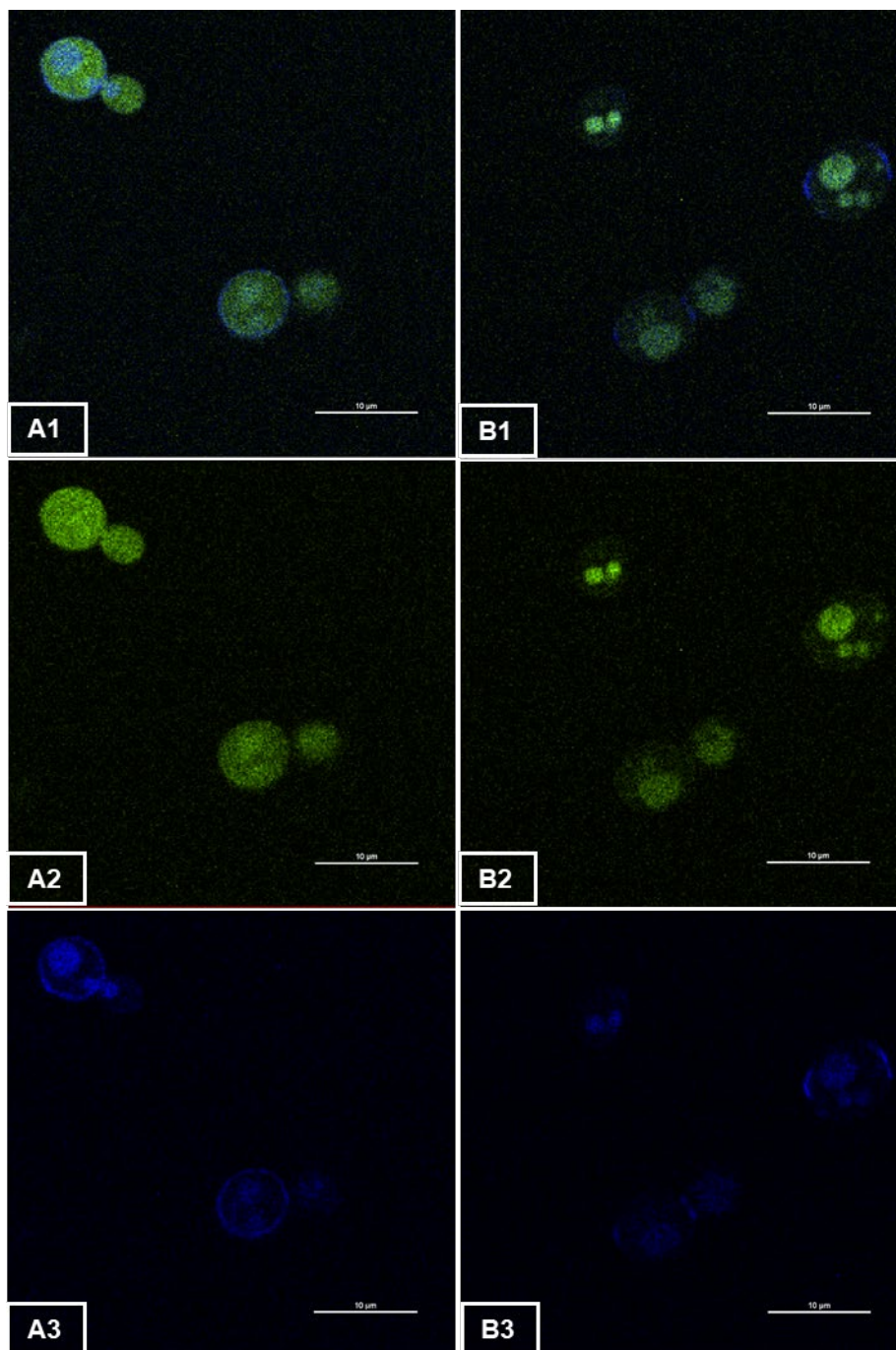


Figure 2.1: Two-photon microscopy observation of (A) the modified strain S3GFP and (B) the wild-type strain S3. The images A2 and B2 were obtained with channel FF01-492/SP (400–492 nm) and A3 and B3 with channel FF03-525/50 (500–550 nm). The images A1 and B1 provided were obtained by merging these two detection channels.

3.2. Growth and fermentation kinetics

We investigated the impact of the integration of the *eGFP* gene into *HO* gene on various phenotypic parameters usually used to evaluate the performance of oenological yeast strains undergoing alcoholic fermentation. The growth of the two yeast strains in Chardonnay must as well as the fermentation kinetics were monitored

by flow cytometry and infrared spectroscopy (IRTF) every day until the complete depletion of sugars (Figure 2.2).

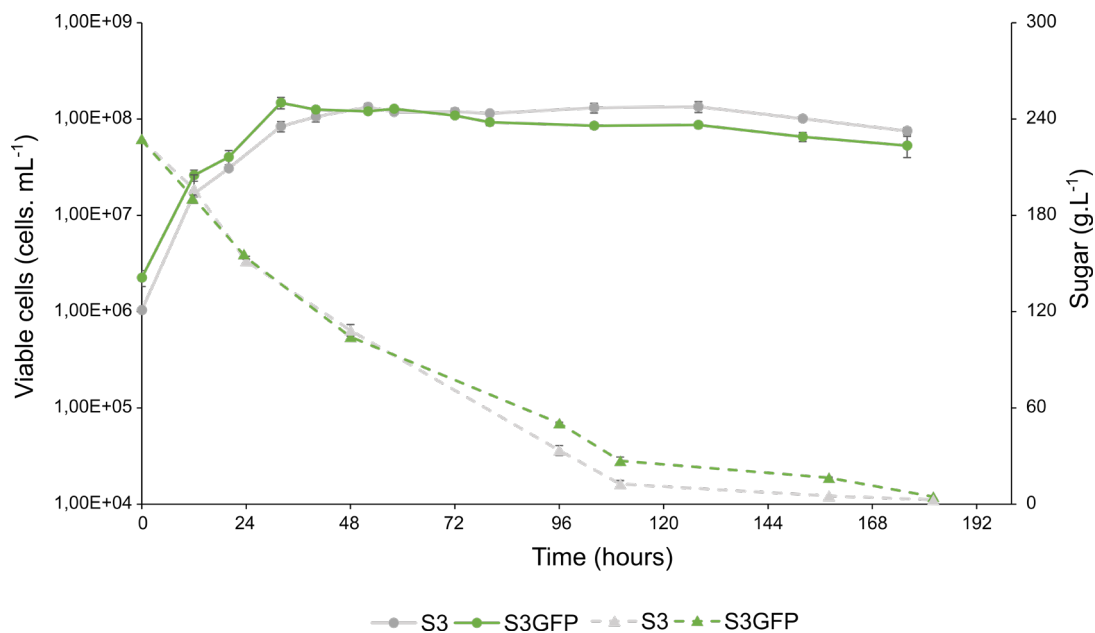


Figure 2.2: Fermentation profile comparison in Chardonnay must. Cell viability and sugar consumption were monitored for the *Saccharomyces cerevisiae* wild-type strain S3 (in grey) and the recombinant strain S3GFP (in green). Solid curves represent viable cell populations and dotted curves represent sugar concentrations. For each strain, the experiments were performed in triplicate and the error bars represent the confidence interval.

The two strains S3 (wild-type strain) and S3GFP (recombinant strain) showed similar growth kinetics.

The maximum growth rate (μ_{max}), the number of generations and the maximum population (K) were determined for each strain (Table 2.2). No significant differences were observed for the different parameters evaluated, which validates the absence of phenotypic impact of the *eGFP* integration into the *HO* gene relative to those growth kinetics parameters [24]. The maximum growth rates (μ_{max}) of strains S3 and S3GFP were $1.37 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ and $1.39 \times 10^{-1} \pm 4 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectively. Both strains also reached equivalent maximum populations ($K_{S3} = 1.42 \times 10^8 \pm 2 \times 10^6 \text{ viable cells.ml}^{-1}$, $K_{S3GFP} = 1.50 \times 10^8 \pm 1 \times 10^7 \text{ viable cells.ml}^{-1}$). As described previously [25], it can be concluded that the interruption of the *HO* gene seems not modify the growth capacity of the modified strain and its fermentative kinetics.

Table 2.2: Growth and fermentation kinetics parameters for strains S3 and S3GFP in Chardonnay must.

Strain	Maximum Population Growth Rate: μ_{Max} (h^{-1})	Generation Number	Maximum Population: K (Viable Cells. mL^{-1})	Maximum Sugar Consumption Rate: V_{max} ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Time to T50 of Sugar Degradation (Hours)
S3	$1.37 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-3}$	4.75 ± 0.18	$1.42 \times 10^8 \pm 2 \times 10^6$	1.80 ± 0.32	45.3 ± 0.9
S3GFP	$1.39 \times 10^{-1} \pm 4 \times 10^{-3}$	4.54 ± 0.16	$1.50 \times 10^8 \pm 1 \times 10^7$	2.06 ± 0.12	43.3 ± 0.4

*Values correspond to the average of three biological replicates \pm standard deviation. Statistical analysis was performed between both strain fermentations (t-test, $\alpha = 0.05$) (NS : no significant).

On the other hand, in order to evaluate the capacity to degrade sugars, the time necessary to degrade half of the sugars available in the medium (T50) and to reach the

maximum speed of consumption of sugars (V_{max}) were defined (Table 2.2). It was observed that the maximum rate was not significantly different, i.e., and $1.80 \pm 0.32 \text{ g.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and $2.06 \pm 0.12 \text{ g.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ for the S3 and S3GFP strains respectively. Similarly, the T50 did not differ significantly ($T50_{S3} = 45.3 \pm 0.9 \text{ h}$ and $T50_{S3GFP} = 43.3 \pm 0.4 \text{ h}$). The results also revealed that the end of fermentation occurred at the same time for both strains (264 h). The fermentative performance of the wild-type strain was maintained despite the integration of the gene encoding the EGFP.

Thus, from the point of view of fermentation and growth kinetics, the HO gene seemed to be a neutral target for *Saccharomyces cerevisiae* transformation.

3.3. [Metabolomic pattern](#)

UPLC-qToF-MS (metabolomic) analysis of post-alcoholic fermentation wines from the two strains studied was performed to evaluate the impact of the yeast genetic modification on its metabolome. Here, 2235 features were detected in both positive and negative ionization modes.

Statistical analysis (t-test, FDR control ($q < 0.05$) and \log_2 (fold change) $> |0.5|$) allowed us to isolate 199 features that significantly discriminated between S3 and S3GFP; therefore, less than 10% of the total number of ions were included. Putative annotation was assigned for each significant extracted feature using an online database (Metlin, KEGG) and the online tool Oligonet. Thus, 151 features were annotated at level 3 according to Schymanski et al. 2014 [27] (Table S1). Therefore, only annotated features were considered to ascertain the impact of the transformation of the *S. cerevisiae* strain, and considered as biomarkers.

A large number of these biomarkers appeared to be unique to each modality. Indeed, 41 and 80 biomarkers were specific to the S3 and S3GFP strains, respectively, while 28 were detected at significantly different concentrations in both strains (Figure 3A). The largest number of biomarkers was found for the modified strain S3GFP. This number of biomarkers highlights the impact of strain transformation.

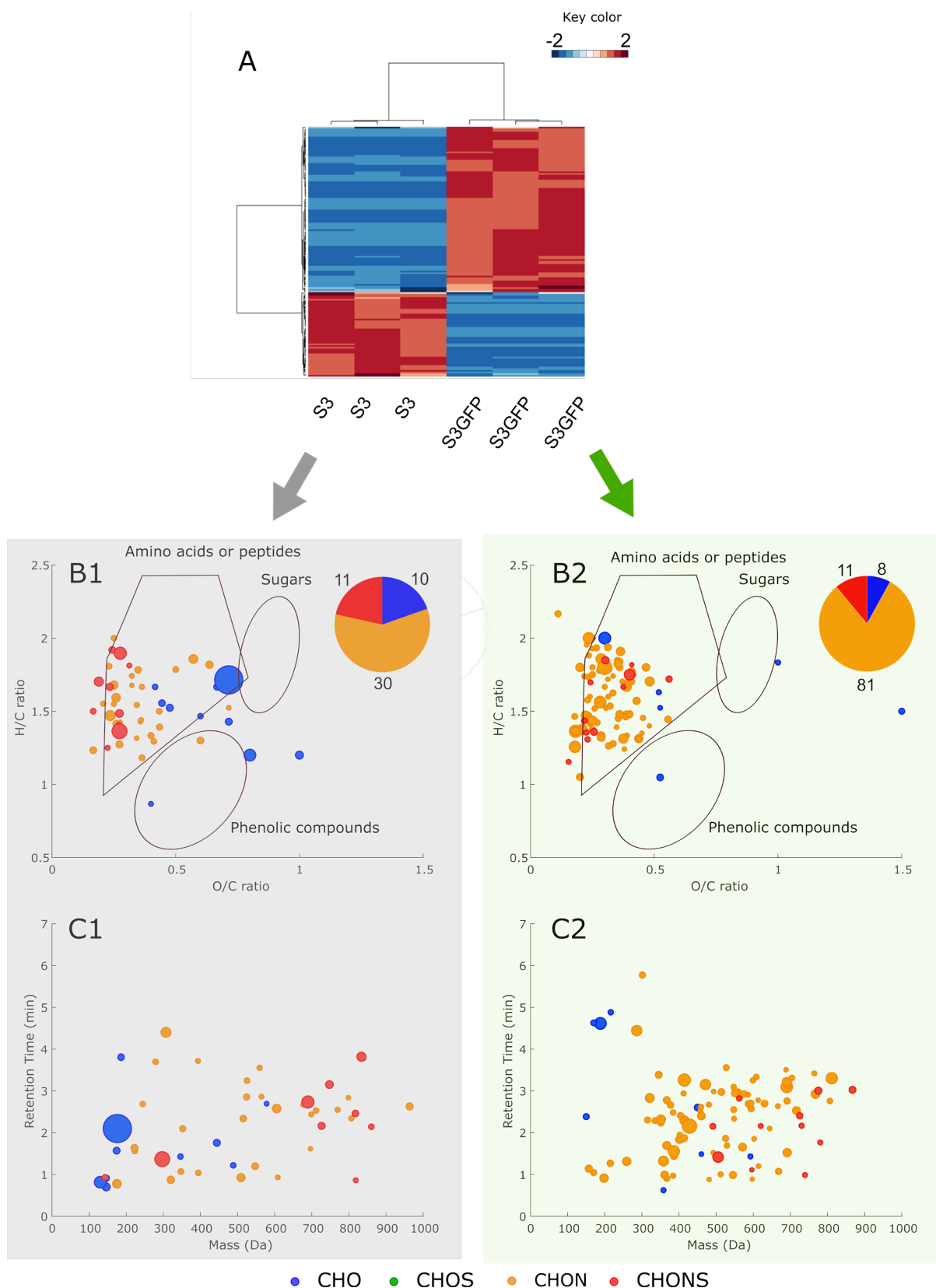


Figure 2.3: (A) Heatmap based on the 151 significantly different annotated compounds for S3 and S3GFP in Chardonnay must. (B1) and (B2) represent the van Krevelen diagrams for the compounds that are significantly more present in S3 and S3GFP (in red on the heatmap), respectively. (C1) and (C2) represent retention time versus mass (Da) for the compounds significantly more present in S3 and S3GFP, respectively. The area of bubbles corresponds to the square root of detected ar-ea divided by 10.

To go further we were interested in the nature of the modifications occurring with the genetic modification of the yeast. Van Krevelen diagrams were established for each strain using the biomarkers most present (Figure 2.3.B). The van Krevelen diagrams were based on their O/C and H/C ratios and associated with the areas of compound families according to the composition of the compounds. We observed a low diversity of composition between the biomarkers of the two strains. Mostly CHON compounds were expressed for both strains, confirmed by the associated pie chart which represents the number of markers classified according to their molecular formulas. This high number of CHON compounds was located where peptides were expected in the van Krevelen diagrams. The associated retention time versus mass plots (Figure 2.3.C) confirmed the predicted family of compounds as peptides by the relative low retention times (< 4 min) using reverse phase column = polar compounds).

However, it was found that the proportion of CHON compounds (which are peptidelike) was significantly higher for the S3GFP strain, with 81% of all biomarkers compared to 59% for the S3 strain. Additionally, we observed a high composition diversity within the compounds in CHO and CHONS that were found in the same number in both strains.

The metabolomic fingerprint of the S3 wild-type strain was modified by the integration of the *eGFP* gene within the *HO* gene in the modified strain S3GFP. Furthermore, this powerful technique allowed us to distinguish the same strain differing only by the integration of a gene within its genome.

We were additionally focused on the hypothetical identity of biomarkers in each strain and the metabolic pathways impacted by the genetic transformation. Among the possible biomarker metabolites of the wild-type S3 strain, propylmalate (Level 3) ($m = 176.0683$ Da, $C_7H_{12}O_5$, RT = 2.1 min) was significantly more present. It has been reported that this compound is an intermediate of leucine biosynthesis [28]. Moreover, it seemed that the main potential annotated compounds for strain S3 were intermediates of amino acid biosynthetic pathways, with the exception of tyrosine, in contrast to most of the annotated markers specific to the S3GFP strain with 82 peptides. In addition, the other biomarkers identified could be involved in the metabolism of ascorbate and aldarate. These latter aspects could contribute towards the hypothesis regarding the response to oxidative stress by the modified yeast S3GFP. Indeed, it has been reported that EGFP can induce oxidative stress [29]. Additionally, tyrosine, peptides, and ascorbate are described as participating in an antioxidant effect [30,31]. However, we were not able to determine if this was related to the cassette insertion or the disruption of the *HO* gene or a polar effect, as very few studies have focused on this. Although some teams have assayed some key metabolites in their research, this remains undetermined. Furthermore, Gui *et al.* in 2021 [24] reported that the location of the integration of the target gene encoding EGFP was a key factor in its transcription.

Indeed, the study of 250 strains of *S. cerevisiae*, in which a gene coding for the EGFP protein was integrated at different locations in the genome, revealed competition for transcriptional responses and resources. This could be due to the recruitment of transcriptional resources by the highly integrated promoter, making them unavailable to nearby genes. Conversely, ricochet effects leading to transcriptional synergy have also been suggested by this team. Moreover, protein folding disorders have been demonstrated during fusion processing with a fluorescent protein [32], and the fusion construct may form a network of interacting proteins leading to aggregation [9]. It has also been described that protein overexpression could lead to an overload of cellular resources for translation, folding, or degradation [33,34]. This overexpression could be generated during this integration or associated with the use of a strong promoter, such as pTEF2.

Finally, the peptides extracted as biomarkers from the S3GFP-transformed strain could be peptides derived from the protein.

IV. Conclusions

This work reported the metabolomic impact of *eGFP* gene integration in the *HO* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Despite similar phenotypes, the production of a hundred new metabolites as well as the overexpression of some by the modified strain compared to the wild-type strain led to the conclusion that the integration of this *eGFP* gene at the chosen location is not neutral. Therefore, a variation of the exo-metabolome was observed, especially on the peptidome. The changes observed, which might be due to either the localization of the integrated cassette, the disruption of the *HO* gene, or the production of EGFP and its derivatives, remain to be studied. However, UHPLC-MS turned out to be useful to describe the impact of transformations on yeast metabolism. Although the changes observed do not seem to affect the phenotype, in our experimental conditions, it would be interesting to check for phenotypic differences in sub-optimal culture conditions.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms10040781/s1>, Figure S1: Scheme illustrating *HO* gene deletion and insertion of DNA donor by CRISPR/Cas9 tool for EGFP *Saccharomyces cerevisiae* tagging.; Table S1: List of annotated biomarkers.

Author Contributions: Conceptualization, F.B., R.R., C.R.-G., C.G., G.K., and H.A.; validation, C.R.-G., A.J.-O. and H.A.; formal analysis, F.B., R.R.; investigation, F.B., R.R.; resources, C.E., C.R.-G., R.D.G., A.J.-O., and H.A.; data curation, F.B., R.R.; writing—original draft preparation, F.B., C.E., R.R.; writing—review and editing, all authors.; visualization, F.B.; supervision, F.B., C.R.-G., A.J.-O. and H.A.; project administration, F.B., C.R.-G., A.J.-O. and H.A.; funding acquisition, C.R.-G., A.J.-O. and H.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work is a part of the METABOLOM (BG0022832.) project supported by the Conseil Régional de Bourgogne-Franche-Comté and the European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 programs.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Dimacell Imaging Facility, Agrosup Dijon, INRA, INSERM, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F- 21000 Dijon France and Pascale Winckler to give access and support to two photons microscopy.

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

V. References

1. Lorang, J.M.; Tuori, R.P.; Martinez, J.P.; Sawyer, T.L.; Redman, R.S.; Rollins, J.A.; Wolpert, T.J.; Johnson, K.B.; Rodriguez, R.J.; Dickman, M.B.; et al. Green Fluorescent Protein Is Lighting Up Fungal Biology. *Appl Environ Microbiol* **2001**, *67*, (1987-1994), doi :10.1128/AEM.67.5.1987-1994.2001.
2. Tatchell, K.; Robinson, L.C. Use of Green Fluorescent Protein in Living Yeast Cells. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, **2002**; Vol. 351, (pp. 661-683) ISBN 978-0-12-182254-5.
3. Momeni, B.; Brileya, K.A.; Fields, M.W.; Shou, W. Strong Inter-Population Cooperation Leads to Partner Intermixing in Microbial Communities. *eLife* **2013**, *2*, e00230, doi :10.7554/eLife.00230.
4. Petitgonnet, C.; Klein, G.L.; Roullier-Gall, C.; Schmitt-Kopplin, P.; Quintanilla-Casas, B.; Vichi, S.; Julien-David, D.; Alexandre, H. Influence of Cell-Cell Contact between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* on Yeast Interactions and the Exo-Metabolome. *Food Microbiology* **2019**, *83*, (122-133), doi :10.1016/j.fm.2019.05.005.
5. Conacher, C.G.; Naidoo-Blassoples, R.K.; Rossouw, D.; Bauer, F.F. Real-Time Monitoring of Population Dynamics and Physical Interactions in a Synthetic Yeast Ecosystem by Use of Multicolour Flow Cytometry. *Appl Microbiol Biotechnol* **2020**, *104*, (5547-5562), doi :10.1007/s00253-020-10607-x.
6. Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous *Hydromedusan, Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology* **1962**, (223-239).
7. Heim, R.; Prasher, D.C.; Tsien, R.Y. Wavelength Mutations and Posttranslational Autoxidation of Green Fluorescent Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, *91*, (12501-12504), doi :10.1073/pnas.91.26.12501.
8. Cormack, B.P.; Valdivia, R.H.; Falkow, S. FACS-Optimized Mutants of the Green Fluorescent Protein (GFP). *Gene* **1996**, *173*, (33-38), doi :10.1016/0378-1119(95)00685-0.
9. Chudakov, D.M.; Matz, M.V.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K.A. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiological Reviews* **2010**, *90*, (1103-1163), doi :10.1152/physrev.00038.2009.
10. Kostriken, R.; Strathern, J.N.; Klar, A.J.S.; Hicks, J.B.; Heffron, F. A Site-Specific Endonuclease Essential for Mating-Type Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **1983**, *35*, 167-174, doi :10.1016/0092-8674(83)90219-2.
11. Russell, D.W.; Smith, M.; Herskowitz, I. Structure of the *Saccharomyces cerevisiae HO* Gene and Analysis of Its Upstream Regulatory Region. **1986**, *6*, 14.
12. Herskowitz, I. Control of Cell Type in *Saccharomyces cerevisiae*: Mating Type and Mating-Type Interconversion. *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, **1981**, 181-209.
13. Martin Chalfie,* Yuan Tu, Ghia Euskirchen, William W. Ward,; Douglas C. Prasher Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression **1994**, 802-804.
14. Weill, U.; Yofe, I.; Sass, E.; Stynen, B.; Davidi, D.; Natarajan, J.; Ben-Menachem, R.; Avihou, Z.; Goldman, O.; Harpaz, N.; et al. Genome-Wide SWAp-Tag Yeast Libraries for Proteome Exploration. *Nat Methods* **2018**, *15*, 617-622, doi :10.1038/s41592-018-0044-9.
15. Weill, U.; Krieger, G.; Avihou, Z.; Milo, R.; Schuldiner, M.; Davidi, D. Assessment of GFP Tag Position on Protein Localization and Growth Fitness in Yeast. *Journal of Molecular Biology* **2019**, *431*, 636-641, doi :10.1016/j.jmb.2018.12.004.
16. Generoso, W.C.; Gottardi, M.; Oreb, M.; Boles, E. Simplified CRISPR-Cas Genome Editing for *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiological Methods* **2016**, *127*, 203-205, doi :10.1016/j.mimet.2016.06.020.
17. Breslow, D.K.; Cameron, D.M.; Collins, S.R.; Schuldiner, M.; Stewart-Ornstein, J.; Newman, H.W.; Braun, S.; Madhani, H.D.; Krogan, N.J.; Weissman, J.S. A Comprehensive Strategy Enabling High-Resolution Functional Analysis of the Yeast Genome. *Nature Methods* **2008**, *5*, 711-718, doi :10.1038/nmeth.1234.
18. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Available online : <https://www.genome.jp/kegg/> (accessed on 27 January 2020).
19. Metlin Available online: https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage (accessed on 27 January 2020).
20. Liu, Y.; Forcisi, S.; Lucio, M.; Harir, M.; Bahut, F.; Deleris-Bou, M.; Krieger-Weber, S.; Gougeon, R.D.; Alexandre, H.; Schmitt-Kopplin, P. Digging into the Low Molecular Weight Peptidome with the OligoNet Web Server. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 11692, doi :10.1038/s41598-017-11786-w.
21. Brachat, A.; Liebundguth, N.; Rebischung, C.; Lemire, S.; Schärer, F.; Hoepfner, D.; Demchyshyn, V.; Howald, I.; Düsterhöft, A.; Möstl, D.; et al. Analysis of Deletion Phenotypes and GFP Fusions of 21 Novel *Saccharomyces cerevisiae* Open Reading Frames. *Yeast*

- 2000**, 16, 241-253, doi :10.1002/(SICI)1097-0061(200002)16:3<241::AID-YEA517>3.0.CO;2-T.
22. Styles, E.B.; Friesen, H.; Boone, C.; Andrews, B.J. High-Throughput Microscopy-Based Screening in *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harb Protoc **2016**, 2016, pdb.top087593, doi :10.1101/pdb.top087593.
23. Yamaguchi, M.; Namiki, Y.; Okada, H.; Mori, Y.; Furukawa, H.; Wang, J.; Ohkusu, M.; Kawamoto, S. Structome of *Saccharomyces cerevisiae* Determined by Freeze-Substitution and Serial Ultrathin-Sectioning Electron Microscopy. Microscopy **2011**, 60, (321-335), doi :10.1093/jmicro/dfr052.
24. Gui, Q.; Deng, S.; Zhou, Z.; Cao, W.; Zhang, X.; Shi, W.; Cai, X.; Jiang, W.; Cui, Z.; Hu, Z.; et al. Transcriptome Analysis in Yeast Reveals the Externality of Position Effects. Molecular Biology and Evolution **2021**, 38, (3294-3307), doi :10.1093/molbev/msab104.
25. Baganz, F.; Hayes, A.; Marren, D.; Gardner, D.C.J.; Oliver, S.G. Suitability of Replacement Markers for Functional Analysis Studies In *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **1997**, 13, (1563-1573), doi :10.1002/(SICI)1097-0061(199712)13:16<1563::AID-YEA240>3.0.CO;2-6.
26. Schymanski, E.L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H.P.; Hollender, J. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. Environ. Sci. Technol. **2014**, 48, (2097-2098), doi :10.1021/es5002105.
27. Baichwal, V.R.; Cunningham, T.S.; Gatzek, P.R.; Kohlhaw, G.B. Leucine Biosynthesis in Yeast: Identification of Two Genes (*LEU4*, *LEU5*) That Affect α -Isopropylmalate Synthase Activity and Evidence That *LEU1* and *LEU2* Gene Expression Is Controlled by α -Isopropylmalate and the Product of a Regulatory Gene. Curr Genet **1983**, 7, 369-377, doi :10.1007/BF00445877.
28. Ganini, D.; Leinisch, F.; Kumar, A.; Jiang, J.; Tokar, E.J.; Malone, C.C.; Petrovich, R.M.; Mason, R.P. Fluorescent Proteins Such as EGFP Lead to Catalytic Oxidative Stress in Cells. Redox Biology 2017, 12, 462-468, doi :10.1016/j.redox.2017.03.002.
29. Lupo, S.; Aranda, C.; Olivera, H.; Riego, L.; González, A.; Miranda-Ham, L.; Servin, L. Tyrosine Is Involved in Protection from Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Can. J. Microbiol. **1997**, 43, 963-970, doi :10.1139/m97-138.
30. Samaranyaka, A.G.P.; Li-Chan, E.C.Y. Food-Derived Peptidic Antioxidants: A Review of Their Production, Assessment, and Potential Applications. Journal of Functional Foods **2011**, 3, 229-254, doi :10.1016/j.jff.2011.05.006.
31. Pedelacq, J.-D.; Cabantous, S. Development and Applications of Superfolder and Split Fluorescent Protein Detection Systems in Biology. IJMS **2019**, 20, 3479, doi :10.3390/ijms20143479.
32. Bordet, F.; Roullier-Gall, C.; Ballester, J.; Vichi, S.; Quintanilla-Casas, B.; Gougeon, R.D.; Julien-Ortiz, A.; Kopplin, P.S.; Alexandre, H. Different Wines from Different Yeasts? "*Saccharomyces cerevisiae* Intraspecies Differentiation by Metabolomic Signature and Sensory Patterns in Wine." Microorganisms **2021**, 9, 2327, doi :10.3390/microorganisms9112327

Conclusions Chapitre 2

Cette étude a permis de mettre en évidence l'impact métabolomique de l'intégration du gène *eGFP* dans le gène *HO* chez *Saccharomyces cerevisiae*. Malgré des phénotypes de croissance et fermentaires similaires, la production d'une centaine de nouveaux métabolites ainsi que la surproduction de certains d'entre eux par la souche modifiée par rapport à la souche sauvage ont permis de conclure que l'intégration de ce gène *eGFP* dans le gène *HO* n'est pas neutre. Ainsi, une variation de l'exo-métabolome a été observée, notamment au niveau du peptidome. Les changements observés qui pourraient être liés soit à la localisation du gène intégré soit à la production de l'eGFP restent à approfondir. Cependant, l'UHPLC-MS s'est avérée utile pour décrire l'impact des transformations sur le métabolisme de la levure.

CHAPITRE 3

INTERACTIONS ENTRE SOUCHES DE *S. CEREVISIAE*

Contexte

Ce dernier chapitre fait l'objet d'une étude incluant trois co-cultures comptant chacune deux souches de *S. cerevisiae*. Les souches caractérisées et sélectionnées dans le premier chapitre présentaient d'importantes différences métabolomiques et conduisaient à des vins aux profils aromatiques distincts. Ces différences de profils aromatique et chimique nous amènent à penser que l'association de deux souches pourraient conduire également à une modulation du profil des vins. Cette étude vise à caractériser l'impact de co-cultures sur vin de Chardonnay et d'appréhender au mieux les mécanismes impliqués dans les possibles interactions intervenant entre deux souches de *S. cerevisiae* mises en présence. Ce dernier axe a été développé selon l'approche intégrative adoptée Chapitre 1.

Les quatre souches sélectionnées parmi les douze caractérisées dans le Chapitre 1, sont les souches S2, S3, S4 et S8. La souche S3 a été incluse dans l'ensemble des couples étudiés. Cette dernière souche a également, subi une modification génétique par intégration d'un gène codant pour une eGFP (développé dans le Chapitre 2) permettant la discrimination de deux souches en présence au sein d'une même culture en cytométrie en flux. Aussi, les expérimentations ont été menées sur trois modalités comprenant chacune la co-culture incluant la souche originale S3, la co-culture incluant la souche modifiée S3GFP et les cultures pures correspondantes.

Etude préliminaire

I. Etude des cinétiques de croissance et fermentaire en jus de raisin standardisé

Dans cette étude préliminaire, nous avons souhaité avoir un premier aperçu de l'évolution des souches sélectionnées en co-culture et évaluer l'impact de cette association de deux souches de *S. cerevisiae* à travers les 3 couples étudiés. En effet, il apparait essentiel de déterminer s'il existe un avantage d'adaptation d'une souche sur l'autre en termes de croissance, mais également appréhender l'impact sur le rendement fermentaire de la co-culture. Cette étude a été menée en jus de raisin standardisé pour les trois modalités S2S3, S4S3 et S8S3. La croissance de chaque souche pour chaque modalité en pure culture ou en co-culture a été suivie par cytométrie de flux toutes les 3 heures pendant 3 jours, puis une fois par jour jusqu'à la fin de la fermentation alcoolique. La performance fermentaire des souches de levures seules ou en couple au cours de fermentation alcoolique a été suivi par spectroscopie infrarouge (IRTF) tous les jours jusqu'à épuisement complet des sucres.

Nous avons comparé la croissance de trois souches de *S. cerevisiae* en cultures pures et en cocultures. Ces dernières combinaient chacune une des trois souches commerciales sélectionnées (S2, S4, S8) avec la souche de *S. cerevisiae* marquée GFP (S3GFP) ou la souche sauvage correspondante (S3). Pour chacune des expérimentations la concentration de l'inoculum était de 1.10^6 cellules viables.ml⁻¹ total, correspondant à 1.10^6 cellules viables.ml⁻¹ pour les souches en cultures pures et 5.10^5 cellules viables.ml⁻¹ pour chacune des souches en co-cultures équivalent à un ratio de 50/50.

Dans le chapitre 2, il a été montré que la souche S3GFP et la souche de type sauvage correspondante avaient des cinétiques de croissance et fermentaires identiques. Par conséquent, seule la souche S3GFP est considérée dans cette section afin de pouvoir suivre la dynamique des deux populations en co-culture au fil du temps et définir les différents paramètres de croissance. Parmi ces derniers, ont été déterminés pour chaque souche en culture pure et en co-culture pour chaque modalité étudiée, la vitesse de croissance maximale (μ max), la population maximale (K), et le nombre de générations pour atteindre cette dernière. La vitesse maximale de dégradation des sucres (Vmax) et le temps de consommation 50% des sucres initiaux fermentescibles (T50) ont été également déterminés pour chaque co-culture et cultures pures associées.

Les résultats sont présentés pour chacune des modalités (S2S3, S4S3 ou S8S3) étudiées.

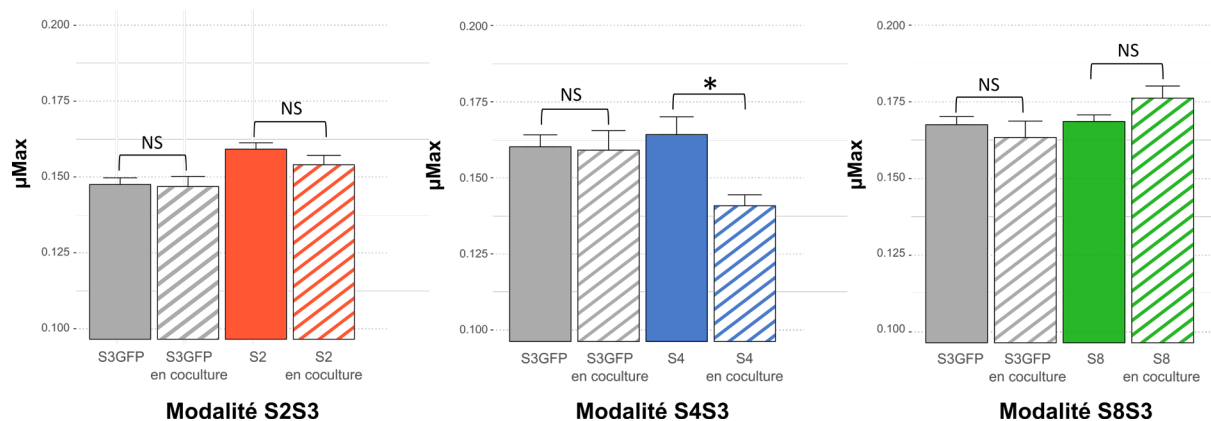


Figure 3.1 : Taux maximal de croissance (μ_{max}) en fonction des cultures pures ou mixtes de *S. cerevisiae* pour chaque modalité : S2S3, S4S3 et S8S3. μ_{max} a été exprimé en h^{-1} . Les valeurs correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques et les barres d'erreur représentent l'écart-type. L'analyse statistique a été effectuée entre S3 et S3GFP pour chaque modalité et entre la culture pure et la co-culture pour chaque souche impliquée dans chaque modalité (test t, valeur $p < 0,05$) (NS : non significatif).

Aucune différence significative n'a été observée en comparant le μ_{max} de S3GFP en culture pure avec le μ_{max} de cette souche en co-culture S4S3GFP (Figure 3.1). Cela a également été observé pour les deux autres modalités, S2S3 et S8S3. Par conséquent, les interactions n'ont pas eu d'impact sur le μ_{max} de la souche S3GFP. Le μ_{max} de la culture pure S4 a été comparé au μ_{max} de cette souche en co-culture et a mis en évidence des différences significatives (Figure 3.1). Les interactions se produisant entre les deux souches ont induit à une réduction du μ_{max} de la souche S4 contrairement aux modalités S2S3 et S8S3 (Figure 3.1). En effet, cette réduction n'a pas été observée pour les modalités S2S3 et S8S3, les μ_{max} de S2 et S8 en coculture ne différant pas pour chaque souche en culture pure. Les μ_{max} déterminés ont ensuite été utilisées pour calculer l'avantage de fitness (m) de chacune des souches en co-culture (Partie 3.3). Pour la modalité S4S3, la valeur m était proche de zéro et légèrement négative ($m = -0,018$) pour S4 vs S3GFP, indiquant un fitness similaire pour les deux souches en co-culture. Cela a également été noté pour les modalités S2S3 et S8S3, avec un m de 0,007 et 0,01 respectivement.

En considérant la population maximale K (Tableau 3.1.A), l'addition des deux populations maximales des deux souches S4 et S3GFP dans la coculture est la même que celle de chaque culture pure associée, c'est-à-dire $1,88 \times 10^8$ cellules viables. ml^{-1} . Cependant, à mi-fermentation, la population de S4 était inférieure à celle de S3GFP. Toutefois, des cinétiques de croissance similaires ont été observées pour les modalités S2S3 et S8S3 en comparant les cultures pures et

les co-cultures. En outre, les souches en co-culture ont présenté des populations équivalentes pendant la fermentation alcoolique, ce qui soutient la référence à des interactions neutres.

Il a également été possible de déterminer le nombre de générations pour atteindre cette population maximale (Tableau 3.1.A). La souche S4 a présenté un nombre de générations significativement différent pour atteindre sa population maximale, soit 5,69 et 4,87, en considérant respectivement la culture pure et la coculture. En effet, la souche S4 a apparemment été légèrement affectée dans son développement au sein de la coculture. Par conséquent, des interactions délétères mineures pour S4 pourraient expliquer cette modulation de la croissance. Contrairement aux modalités S2S3 et S8S3, aucune différence n'a été observée, indiquant une fois de plus, que les interactions étaient neutres.

Du point de vue des cinétiques fermentaires il n'est pas possible de dissocier les deux souches au sein de la coculture. Ainsi, les V_{max} et T50 de chaque culture pure ont été comparés aux V_{max} et T50 de la co-culture associée (Tableau 3.1.B).

La coculture S4S3 ne présentait aucune différence significative de V_{max} par rapport à la souche S4 en culture pure. Pour les deux autres souches, une différence de V_{max} a été observée en considérant les cultures pures et les co-cultures. Cependant, en examinant les données, il est apparu que la valeur de V_{max} des cocultures étaient des intermédiaires des V_{max} des S2 ou S8 et S3GFP en culture pure et ne différaient pas significativement de la moyenne de ces derniers. Par conséquent, les interactions entre deux souches de *S. cerevisiae* n'ont pas affecté le V_{max} . Le temps pour dégrader 50% des sucres fermentescibles initiaux (T50) s'est avéré non significativement différent si l'on considère la culture pure de la souche S3GFP et les co-cultures, des modalités S2S3 et S4S3. Toutefois, la valeur de T50 de la co-culture S8S3 bien que significativement différente des deux cultures pures associées était un intermédiaire des T50 des deux T50 des cultures pures. De même, cela a été observé pour les souches S2, S4 et S8 en considérant les T50 des cultures pures et des co-cultures correspondantes. Ainsi, il a donc été observé que le T50 n'était pas négativement impacté par les interactions pour ces deux modalités.

Tableau 3.1 : Paramètres (A) de cinétique de croissance et (B) de cinétique fermentaire mesurés pour chaque souche dans chacune des trois modalités (S2S3, S4S3 et S8S3) en moût de Chardonnay.

(A)

	Souche	Vitesse maximale de croissance: μ max (h ⁻¹)	Population maximale: K (cellules viables.ml ⁻¹)	Nombre de générations pour atteindre la population maximale
S2S3	S3GFP	0.148 ± 0.00	2.06.10 ⁸ ± 1.10 ⁷	5.11 ± 0.06
	S3GFP en co-culture	0.147 ± 0.00] NS	7.90.10 ⁷ ± 3.10 ⁶] *	5.08 ± 0.08] NS
	S2	0.155 ± 0.00	1.51.10 ⁸ ± 4.10 ⁶	5.51 ± 0.05
	S2 en co-culture	0.154 ± 0.00] NS	7.31.10 ⁷ ± 2.10 ⁶] *	5.33 ± 0.07] NS
S4S3	S3GFP	0.160 ± 0.00	1.86.10 ⁸ ± 4.10 ⁶	5.55 ± 0.10
	S3GFP en co-culture	0.159 ± 0.01] NS	1.00.10 ⁸ ± 4.10 ⁶] *	5.51 ± 0.17] NS
	S4	0.164 ± 0.00] *	1.36.10 ⁸ ± 2.10 ⁶] *	5.69 ± 0.15] *
	S4 en co-culture	0.141 ± 0.00	8.28.10 ⁷ ± 7.10 ⁶	4.87 ± 0.09
S8S3	S3GFP	0.168 ± 0.00	2,64.10 ⁸ ± 4.10 ⁷	5.80 ± 0.07
	S3GFP en co-culture	0.163 ± 0.00] NS	1,46.10 ⁸ ± 4.10 ⁷] *	5.66 ± 0.14] NS
	S8	0.169 ± 0.00	2,57.10 ⁸ ± 1.10 ⁷	5.84 ± 0.06
	S8 en co-culture	0.176 ± 0.00] NS	9,73.10 ⁷ ± 1.10 ⁶] *	6.10 ± 0.10] NS

(B)

	Strains	Vitesse maximale de dégradation des sucres: V_{max} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Time to T50 of sugar degradation (heures)
S2S3	S3GFP	1.56 ± 0.02	79.67 ± 0.44
	S2	2.14 ± 0.04] *	72.33 ± 1.10] *
	S2S3GFP coculture	1.73 ± 0.04] NS	78.33 ± 0.44] NS
S4S3	S3GFP	3.62 ± 0.24	82.3 ± 0.44
	S4	2,98 ± 0.13] NS	83.8 ± 0.22] *
	S4S3GFP coculture	3,62 ± 0.24] NS	82.7 ± 0.44] NS
S8S3	S3GFP	2.27 ± 0.02	56 ± 0.00
	S8	2.38 ± 0.06] *	56 ± 0.00] *
	S8S3GFP coculture	2.27 ± 0.02] NS	60.1 ± 0.89] *

Les valeurs correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques ± l'écart-type. L'analyse statistique a été réalisée entre les deux souches en culture pure et en co-culture (test t, valeur p ≤ 0,05) (différence significative, NS : non significatif).

La présence de deux souches de *S. cerevisiae* et les interactions pouvant intervenir entre elles n'ont conféré d'avantage de fitness à l'une ou l'autre des souches présentes. Cependant, ces interactions pourraient induire une modulation de la population, comme pour la modalité S4S3. Les interactions se sont révélées être dépendantes de la souche. De plus, il a été observé que la cinétique fermentaire n'était pas affectée par les interactions.

Aussi, une étude préalable a été menée à l'échelle de l'exo-métabolome en moût de Chardonnay commun l'ensemble des expérimentations majeures menées dans le cadre des trois axes de thèse. Cette analyse de la composition chimique des vins issus de la fermentation alcoolique menée par des *S. cerevisiae* en culture pure ou en co-culture a été réalisée par FT-ICR-MS couplée à des analyses statistiques multivariées.

II. Analyse du métabolome non volatile

Comme évoqué précédemment, cette analyse a été réalisée uniquement sur les conditions culture pure et co-cultures comprenant la souche S3 originale. En effet, l'intégration du gène *eGFP* au sein du génome de *S. cerevisiae* a induit des modifications métabolomiques non négligeables. Ainsi, le traitement des données et leur interprétation se sont focalisées sur les conditions comprenant la souche S3 couramment utilisée en conditions réelles.

Les résultats sont présentés pour chacune des modalités (S2S3, S4S3 ou S8S3) étudiées.

14 923 masses détectées par FT-ICR-MS ont été extraites. Parmi ces dernières, les masses uniques ont été exclues pour le traitement des données, ce qui a permis de retenir 6 545 masses et de les associer à une formule élémentaire potentielle (Niveau 3). Afin de visualiser les phénomènes d'interaction, nous nous sommes intéressés à décrire l'impact sur la composition du vin en fonction des souches utilisées pour conduire la fermentation. Aussi, nous avons comparé pour chaque modalité, les cultures pures avec la co-culture correspondante. Des analyses statistiques ANOVA (p-value <0.05) ont été réalisées sur chaque modalité correspondant à chaque souche S2, S4 ou S8 mise en œuvre. Les formules élémentaires qui présentaient des différences significatives d'intensité ou présentes uniquement dans une des conditions ont été extraites et considérées comme des biomarqueurs. Un diagramme de Venn pour chaque modalité comprenant les cultures pures et la co-culture a été réalisé et présenté Figure 3.2.A.

Nous avons pu observer que quelle que soit la modalité étudiée, la distribution du nombre de formules élémentaires était similaire au sein des échantillons. Les co-cultures ont entraîné une

modification de l'exo-métabolome. En effet, certains nouveaux métabolites ont été détectés en co-culture alors qu'ils étaient absents dans chaque culture pure. Inversement, certains composés présents dans chaque culture pure étaient absents en co-culture. Par exemple, pour la modalité S2S3, 269 composés n'ont été détectés qu'en co-culture alors que les souches S2 et S3 en culture pure sont caractérisées par 438 et 224 composés uniques respectivement. Cela suggère que les vins issus de la co-culture ne sont pas de simples additions de vins issus de cultures pures et suggère une interaction entre les souches conduisant à une composition métabolomique différente.

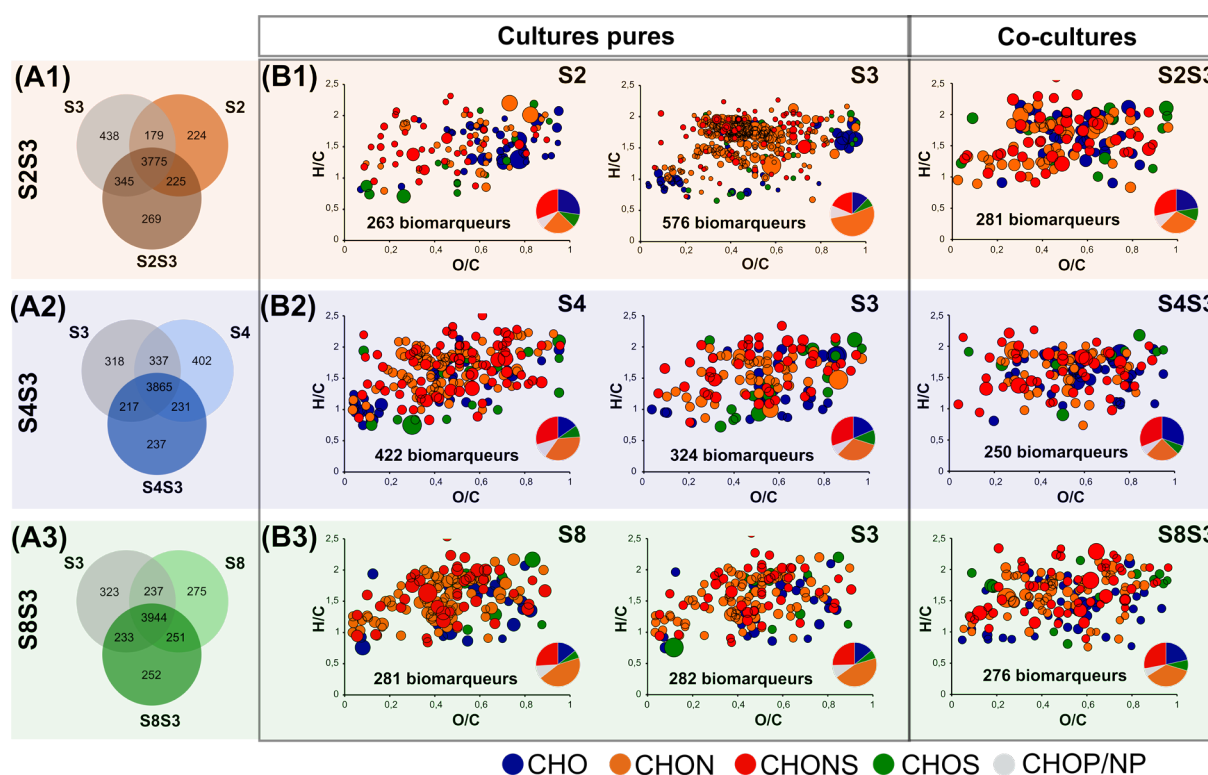


Figure 3.2 : (A) Diagrammes de Venn des co-cultures et cultures pures correspondantes pour chaque modalité S2S3, S4S3 et S8S3. (B) Les biomarqueurs des co-cultures et cultures pures correspondantes sont mis en évidence dans des diagrammes de van Krevelen et des diagrammes circulaires représentant la composition des formules moléculaires. La taille des bulles indique les intensités relatives des pics correspondants dans les spectres

Afin de considérer la nature des changements métabolomiques lors de l'association des deux souches de *S. cerevisiae*, les empreintes métabolomiques (Figure 3.2.B) de chaque échantillon au sein de chaque modalité ont été établis. Notamment, nous avons observé, que pour toutes les modalités, l'empreinte de la co-culture différait de celle des deux cultures pures. Ainsi, des changements ont été dégagés tant dans la diversité de la composition chimique que dans l'abondance des biomarqueurs. Par exemple, pour la modalité S2S3, l'empreinte des co-cultures ressemble davantage à celle de la culture pure S2. En effet, seulement 263 biomarqueurs sont spécifiques de S2 et présentaient une majorité de composés en CHO et CHONS similaire à la

co-culture tandis que la culture pure S3 présente 596 biomarqueurs dont 53% étaient des composés CHON. Ceci indiquerait des phénomènes d'interactions non visible à l'échelle microbiologique. Cependant, selon la modalité, des schémas différents sont apparus. Pour la modalité S8S3, le nombre de biomarqueurs est équivalent pour les cultures pures (282 et 281) et la co-culture (276), pouvant être associé des phénomènes d'interactions neutres, ce qui contraste avec la modalité S4S3. En effet, la co-culture S4S3 arbore significativement moins de biomarqueurs que les deux cultures pures associées, aussi cela informe sur l'existence d'interactions importantes entre les deux souches lors de leur association. De plus, on peut souligner que la composition des biomarqueurs des deux souches en cultures pures est équivalente mais diffère de la co-culture avec une légère diminution du nombre de composés dans CHON et une augmentation dans CHO.

Ces résultats révèlent des interactions entre deux souches de *S. cerevisiae*, bien que la cinétique de croissance et de fermentation ne soit pas toujours affectée. Le suivi de la population dans le temps n'est donc pas suffisant pour mettre en évidence un phénomène d'interactions.

Article

Article à soumettre dans le journal Food chemistry

Chardonnay interaction characterization within *Saccharomyces cerevisiae* species

Fanny Bordet^{1,4}, Rémy Romanet¹, Florian Bahut⁴, Jordi Ballester², Cristina Peña³, Vicente Ferreira³, Régis Gougeon¹, Anne Julien-Ortiz², Chloé Roullier-Gall¹, Hervé Alexandre¹

¹ Univ. Bourgogne Franche-Comté, Institut Agro Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France-IUVV, rue Claude Ladrey, BP 27877, 21078 Dijon CEDEX, France; bordet.fanny@gmail.com (F.B.); remy.romanet@u-bourgogne.fr (R.R.), Chloe.Roullier-Gall@u-bourgogne.fr (C.R.-G.), regis.gougeon@u-bourgogne.fr (R.G.);rvalex@u-bourgogne.fr (H.A.)

² Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne - Franche-Comté, F-21000 Dijon, France; jordi.ballester@u-bourgogne.fr (J.B.)

³ University of Zaragoza, Dpt. Química Analítica. Facultad de Ciencias, 50009 Zaragoza. Spain; cpena@posta.unizar.es (C.P), vferre@unizar.es (V.F.)

⁴ Lallemand SAS, 19 rue des Briquetiers, Blagnac CEDEX, France; fbahut@lallemand.com (F.B.), ajulien@lallemand.com (A.J.-O.)

Abstract

Yeast co-inoculations in oenology are often studied for the modulation of the aromatic profiles of wines. Our study aimed to investigate the impact of three cocultures and associated pure cultures of *S. cerevisiae* on the chemical composition and sensory profile of Chardonnay wine. This work reports changes in the wine volatilome and sensory profiles attributed to yeast interactions. Esters, fatty acids and phenol families were identified as affected. The sensory profiles and metabolome of the cocultures, corresponding pure cultures and associated blend from both pure cultures were found to be different. The coculture did not turn out to be the addition of the two pure culture wines, indicating the impact of interaction. High resolution mass spectrometry (HRMS) revealed thousands of biomarkers. The metabolic pathways involved in these wine composition changes were highlighted, most of them belonging to nitrogen metabolism.

Keywords: yeast-yeast interaction, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, metabolomics, volatilome, sensory analysis

I. Introduction

Microorganisms coexist in complex consortia within the various ecosystems of our environment. This coexistence is now known to involve interactions that can be positive, negative, or neutral. Many ecological niches have been described as hosting these consortia, including the wine niche. A large diversity of microorganisms is found on the grape berry (Barata et al., 2012; Fleet, 2003) which decreases during the winemaking process. This loss of diversity is induced both by environmental conditions and by the interactions between microorganisms. Also, during alcoholic fermentation, the fermentative yeasts predominate and will coexist. This cohabitation gives rise to different types of interactions and has been widely studied in recent years (Comitini et al., 2021; Mencher et al., 2021; Zilelidou & Nisiotou, 2021). Until now, most

studies have focused on interactions in the context of two micro-organism cocultures, although studies of more complex consortia are emerging (Bagheri et al., 2017; Conacher et al., 2020). Different mechanisms of interactions and their impact on wine composition have been described (Bordet et al., 2020). These interactions were often found to be non-neutral, leading to a change of the metabolism and/or growth of one or both populations. In general, studies have focused on the interactions between *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts for various applications such as avoiding the risks of stuck fermentations, improving the specific sensory profiles of products, ethanol reduction or the control of spontaneous or unwanted microorganisms (Contreras et al., 2014; Domizio et al., 2011; Englezos et al., 2019; González et al., 2018; Medina et al., 2013). However, there information on the interactions between yeasts within the same genus or species is limited. Interactions were highlighted between a *Saccharomyces cerevisiae* strain and a *Saccharomyces bayanus* strain, and between two *S. cerevisiae* strains by comparing cocultures to pure cultures and mixing wines resulting from the fermentation of isolated yeasts (Capece et al., 2013; Howell et al., 2006; King et al., 2008). These mechanisms can be studied using different approaches, including specific metabolite quantification, and the assessment of nutrient uptake and consumption (Petitgonnet et al., 2019; Rollero et al., 2018; Scott et al., 2021). Nevertheless, the monitoring of population dynamics remains essential to understand the types of interactions and give insights into the mechanisms involved (Bordet et al., 2020). Moreover, between yeasts of the same genus or species, discriminating the populations involved remains a complex step. It is necessary to find keys to lift this technological barrier in both classical culture techniques and flow cytometry enumeration. In flow cytometry, yeast fluorescent labeling is increasingly used to study cocultures or more complex consortia (Conacher et al., 2020; Petitgonnet et al., 2019). In addition to cell counting, this technique is used to obtain information on the physiological state of cells during monitoring.

In addition, other approaches are used to determine the impact of coculture on genome expression, its regulation and yeast metabolism. Indeed, new omics technologies including proteomics (Peng et al., 2019) and transcriptomics (Curiel et al., 2017; Tronchoni et al., 2017) have been applied to the study of these interactions. However, metabolomics, used in our study, provides information well beyond cell phenotype according to genome and its expression under specific environmental conditions, offering an overview of possible biochemical regulations. A phenotypic representation of microorganisms is given in accordance with their genetic background, regulation, and expression under environmental changes (Pinu, 2018). Recently, ultrahigh resolution mass spectrometry (uHRMS) has revealed interactions between *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* (Petitgonnet et al., 2019; Roullier-Gall et al., 2020, 2021) Differences in wine composition were demonstrated when comparing cocultures involving a strain of *S. cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans*, *Starmmerella bacillaris*, *Metschnikowia pulcherrima* with pure cultures, showing the presence of interaction phenomena. The wine chemical composition obtained from cocultures

appeared to differ with the addition of the two metabolomes of single strains (Roullier-Gall *et al.*, 2020, 2021). Moreover, a specific interaction mechanism was revealed by the study, with or without cell-cell contact between the two yeast species. Indeed, cell-cell contact between *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* induces the production of new metabolites and quantitative metabolite changes (Petitgonnet *et al.*, 2019). The use of this technique provides new insights, but this is only part of the picture when characterizing micro-organisms and their interaction more precisely.

Besides changes in primary metabolism, many studies have reported modulations of the composition of the volatilome in the context of coculture involving *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces*. Several families of volatile compounds were described as being involved, such as esters, higher alcohols, and fatty acids (Bordet *et al.*, 2020; Ciani *et al.*, 2020; Fleet, 2003). Morales *et al.*, 2019 showed that of 2-phenylethyl acetate and isoamyl acetate concentration increased when combining *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* compared to pure *S. cerevisiae* fermentation conditions. This was also observed by Binati *et al.*, 2019; Nisiotou *et al.*, 2018 or in the context of the coculture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* by Renault *et al.*, 2015. Similarly, coculture can increase the higher alcohol content of wines. This has been detailed by Sadoudi *et al.*, 2012 for mixed fermentations with *Candida zemplinina* and *S. cerevisiae* for *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*, and Escribano *et al.*, 2018, and *S. cerevisiae* and Englezos *et al.*, 2018, 2019, for *S. bacillaris* and *S. cerevisiae*. Medium chain fatty acids were found mostly decreased in coculture compared to pure culture, as observed by Nardi *et al.*, 2019. The sensory aspect was also addressed by researchers but few of them linked it to volatile compounds and interactions (Balikci *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). Changes at the sensory scale have been highlighted for wines obtained from cocultures, thereby confirming interactions between microorganisms (Fleet, 2003). However, most studies have focused on the interactions between *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces*.

These aromatic volatile compounds modifications of wine resulting from interaction phenomena may be a way to modify the sensory profile of a wine. Furthermore, the majority of studies on these interactions focus on a set of different cocultures of strains, and often revolve around the global comparison of these sets of cocultures with their corresponding pure cultures. Thus, interactions are not sufficiently detailed and discussed from the perspective of a given coculture versus the associated single strains, therefore not allowing for in depth establishment of differences between the two cultivation modes for these given strains. An integrative approach combining different targeted and non-targeted approaches is essential (Bordet *et al.*, 2021; Pinu, 2018). Therefore, in this study, we were interested in determining whether this type of interaction existed within the same species, in this case *S. cerevisiae*. In our study, we investigated for the first-time interactions occurring between different *S. cerevisiae* strains under coculture using an integrative approach.

II. Materials and methods

2.1. *Saccharomyces cerevisiae* strains

A total of five strains of *Saccharomyces cerevisiae* were used in this study. Four commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* (Lallemand Inc., Montreal, QC, Canada) were selected (coded S2, S3, S4 and S8) from among the strains considered in our previous work (Bordet et al., 2021). These commercial strains were coded S2, S3, S4 and S8 were supplied as ADY and stored at 4°C once opened. The other strain was a modified *Saccharomyces cerevisiae* strain supplied by the VALMiS team, Burgundy University Vine and Wine Institute: *S. cerevisiae* S3GFP, a derivative of the commercial strain S3 modified by CRIPSR-Cas 9 to strongly express eGFP (Bordet et al., submitted). This modified strain was stored at -80°C in YPD liquid medium (0.5% w/v yeast extract (Biokar, Beauvais, France), 1% w/v bactopectone (Biokar), 2% w/v D-glucose (Prolabo, Fontenay sous-Bois, France) and 0.02% w/v chloramphenicol (Sigma, St Louis, MI, USA), containing 20% v/v glycerol.

2.2. Growth conditions

The modified strain was isolated on YPD plate (YPD liquid with 2% w/v agar (Biokar, Pantin, France)) at 28°C. One colony was added in YPD liquid medium at 28°C for 24h. Following the rehydration of commercial yeast and the suspension of modified yeast, all the strains were grown as previously described (Bordet et al., 2021). Briefly, each strain was diluted at 0.1% (v/v) concentration in 250 ml sterile Erlenmeyer flasks containing 150 ml of modified YPD medium and closed with dense cotton plugs. After incubation for 18h at 28°C under agitation (150 rpm), the second culture, in 150ml of pasteurized Chardonnay must, filtered on a 0.22 µm membrane (Steritop-GP, MERCK-Millipore, Burlington, Massachusetts, United States), was performed in Erlenmeyer flasks (250 ml) at 28°C without stirring for 18h.

2.3. Fermentation conditions

Fermentations were carried out in triplicate in pasteurized Chardonnay must containing 226.6 g.l⁻¹ glucose/fructose, pH 3.92, and 343.1 mg.l⁻¹ total assimilable nitrogen.

Pure fermentations and co-fermentations were conducted in 2 l sterile bottles containing 1 l of Chardonnay must and closed with sterile cotton wool. For each condition, three biological replicates were conducted at 20°C in static mode. The end of fermentation was considered as the total depletion of sugars.

Pure fermentations were inoculated with the most recent must cells cultures at 1×10⁶ viable cells.ml⁻¹. Co-fermentations were inoculated by two *S. cerevisiae* as explained in Table 3.2. Each strain was inoculated at 5×10⁵ viable cells.ml⁻¹, also from Chardonnay must cultures. Daily sampling was carried out.

Table 3.2 : Description of each condition with the proportion of each strain. Orange, blue and green colors correspond to S2S3, S4S3 and S8S3 modalities, respectively.

		Conditions (% of each strain for each condition)										
		S3	S3GFP	S2	S4	S8	S2/S3	S2/ S3GFP	S4/S3	S4/S3GFP	S8/S3	S8 /S3GFP
		Yeast strains	S3	100	-	-	-	-	50	-	50	-
S3GFP	-		100	-	-	-	-	50	-	50	-	50
S2	-		-	100	-	-	50	50	-	-	-	-
S4	-		-	-	100	-	-	-	50	50	-	-
S8	-		-	-	-	100	-	-	-	-	50	50

We compared pure cultures of three strains of *S. cerevisiae* and cocultures, combining each of the three commercial strains (S2, S4, S8) with one GFP-labelled *S. cerevisiae* (S3GFP) or its corresponding wild-type strain (S3). For each of the approaches used, the results are presented for each of the modalities (S2S3, S4S3 and S8S3) under study according to the three corresponding fermentations: pure cultures of each strain, cocultures of the commercial strain with the S3 strain and cocultures of the commercial strain with the S3GFP strain (Figure 3.1).

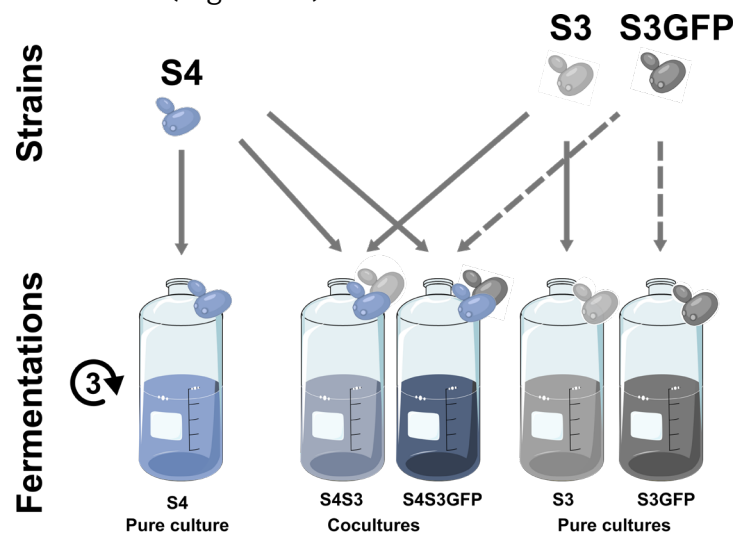


Figure 3.3: Experimental design and sample generation for the S4S3 modality

2.4. Growth monitoring

Cell viability in preculture and during fermentation was determined by flow cytometry. Dissolved Propidium Iodide (PI) (Invitrogen, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) in water at a concentration of 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ was used as fluorochrome. We added 1 μl of PI to 100 μl of diluted suspension in PBS buffer (137mM NaCl, 2.7mM KCl, and 11.9mM Phosphate, pH 7.2) (Fisher Scientific, Illkirch, France). Samples were incubated in the dark 15 min before analysis. Flow cytometry

was performed with a BD Accuri C6 flow cytometer (Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, United States), and the resulting data were processed using the BD Accuri C6 software. For each sample, 20 μl was analyzed at 34 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. The FSH threshold used was 80,000. A 488-nm wavelength argon laser was used to excite the cells (autofluorescence). GFP fluorescence was assessed on the FL1-H band pass filter (533/530 nm), PI fluorescence was measured on the FL3-H long pass filter (675 nm) and side-scatter light (SSC)/fluorescence intensity data were analyzed.

2.5. Growth kinetics parameters and *S. cerevisiae* fitness advantage

An assessment of growth kinetics parameters of strains in pure and coculture was performed. The maximum growth rate (μ_{max}), maximal population (K) and generation number to reach maximal population were determined. The fitness advantage (m) between two microorganisms can be defined, as developed by García-Ríos et al., 2014, by the following expression: $m = r_1 - r_2$, where m corresponds to the μ_{max} difference of two strains (r_1 and r_2) under specific environmental conditions. In this study, we generated the m value with the comparison of each strain in coculture, for example $m = \mu_{\text{max}} S4 - \mu_{\text{max}} S3GFP$.

A T-test was performed to compare each parameter between pure culture and coculture conditions for each modality. An ANOVA was also performed on the data by modality, followed by the Tukey HSD post-hoc test to define differences between the conditions two by two, using R software (R-4.0.4).

2.6. Analytical methods

2.6.1. Oenological analysis

Samples were centrifuged at 8,000 x g for 5 min at 4 °C. Sugar concentration and ethanol degree were monitored daily by FTIR (Fourier-transformed infrared) spectroscopy (OenoFOSS™, FOOS, Hilleroed, Denmark). Fermentation kinetics could be established as follows: sugar concentration vs time. The maximal rate of sugar degradation and time to degrade 50% of the initial fermentable sugars were determined graphically. Student's test was performed to compare these two parameters between pure culture and coculture conditions in each modality and an ANOVA ($p\text{-value} \leq 0.05$) was performed followed by a Tukey test on the data by modality (S2S3, S4S3, and S8S3) using R software (R-4.0.4).

2.6.2. Volatilome analysis

Volatile compounds were determined by high performance gas chromatography. The major compounds were determined using the method developed for major volatile compounds based on the gas chromatographic-flame ionization detection analysis (GC-FID) of dichloromethane microextracts, as developed previously (Ortega et al., 2001). Briefly, 3 ml of wine was placed in 15 ml screw-capped centrifuge tubes containing 4.5 g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7 ml of water, 15 μl of internal standard solution C and 0.2

ml of dichloromethane. The samples were shaken and centrifuged. The dichloromethane phase was recovered and transferred in a vial for analysis. Analytes were separated on a DB-20 column from J&W Scientific (Folsom, CA, USA), with a length of 50 m, an internal diameter of 0.32 mm and a film thickness of 0.5 μm . The column temperature was held at 40°C for 5min, then increased to 200°C at a rate of 3°C.min⁻¹. The injection was fixed for 3 μl in split flow at a rate of 30 ml.min⁻¹. Dihydrogen at a flow rate of 3 ml.min⁻¹ was used as the carrier gas. Detection was by FID. The concentration of each specific compound was determined by computing the relative response areas to the corresponding internal standard. The measured relative area was then interpreted using the calibration graphs obtained by analyzing synthetic wines (2% (v/v) ethanol, 5 g.l⁻¹ tartaric acid and pH adjusted to 3.2 with 1 M sodium) containing known amounts of the volatile compounds.

The minor and trace volatile compounds analyzed by solid-phase extraction (SPE) and gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS) was carried out following the method described by López *et al.*, 2002. This fraction was analyzed with a star 3400 CX gas chromatograph coupled to a Saturn 4 electronic impact ion trap mass spectrometer (Varian). Before analysis, the metabolites were separated on a DB-WAXetr (J&W, Folsom, USA) with a length of 60 m, an internal diameter of 0.25 mm and a film thickness of 0.5 μm and preceded by a 30 m \times 0.32 mm uncoated precolumn. The oven temperature was held at 40°C for 5min, then increased to 230°C at a rate of 2°C.min⁻¹. The carrier gas was helium at 1 ml.min⁻¹. 3 μl of samples after extraction by SPE (Vac ELUT 20 station from Varian) were injected in a 1093 septum equipped programmable injector (SPI) (Varian). The initial temperature of this injector was 30°C for 0.6 min and then raised to 230°C at 200°C.min⁻¹. The extracted ion chromatogram was taken for comparison with the chemical standards and quantification by peak area. Volatile compound quantification data were processed by performing an ANOVA (p-value<0.05) followed by a Tukey test. All the results were processed using R software (R-4.0.4).

2.6.3. Non-volatile metabolome analysis

Wine samples were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography (Dionex Ultimate 3000, ThermoFischer, Waltham, MA, USA) coupled to a MaXis plus MQESI-Q-ToF mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany). Nonpolar compounds were separated by reverse phase liquid chromatography (RP-LC) on an Acquity UPLC BEH C18 1.7 m column 100 \times 2.1 mm (Waters, Guyancourt, France). Buffer A (5% (v/v) acetonitrile with 0.1% (v/v) formic acid) and buffer B (acetonitrile with 0.1% (v/v) formic acid) constituted the mobile phase used to elute the metabolites according to the following gradient: 5% (v/v) buffer B from 0 to 1.10 min followed by a linear increase in the proportion of buffer B from 1.10 to 6.40 min to reach 100% of the latter for 3.6 min, with a constant flow rate of 0.4 ml. min⁻¹ maintained during the analysis. Ionization was implemented in negative and positive mode with an electrospray ionization source at a nebulization pressure of 2 bar and a dry nitrogen flow of 10 L.min⁻¹. The mass

spectrometer parameters were as follows: ion transfer (end plate offset at 500 V), capillary voltage (at 4500 V in positive ionization mode and at 3500 V in negative ionization mode), and acquisition (mass range 100-1500 m/z). Fragmentation was realized at 8 Hz spectra rate using autoMS/MS function (20 – 50 eV).

Before each batch analysis, Na Formate cluster was injected directly into the source to perform an external calibration of the mass spectrometer. This calibration was carried out in "enhanced quadratic" mode with an error of less than 0.5 ppm. An internal calibration allowing a post-acquisition recalibration was also performed. The mass range was between 100 and 1500 m/z . Na Formate cluster was injected at the beginning of each sample injection using a bypass system. Inter-batch (standard peptide and polyphenol mixture) and intra-batch (experimental QC, sample mixture) quality controls were performed to ensure the repeatability and stability of the system during the analysis (Supplemental Figure S3.2). All the samples were randomly injected into the same batch to avoid batch-to-batch variability. Samples were centrifuged at 10500 $\times g$ for 10 min.

After acquisition, the data were analyzed using Bruker Compass MetaboScape v5.0 software (Bruker, Bremen, Germany). The raw mass spectra of each sample were recalibrated, extracted (intensity thresholds 1000) and aligned. Features were extracted if they are present in more than 20% of the samples. The data resulting to positive and negative ionization mode were merged in one dataset, with tolerance, 5 ppm for m/z and 10 sec for retention time. 5191 buckets were obtained. Elementary formula was determined using isotopic profile and in house database (tolerance: 5 ppm and $mSigma < 20$). Only annotated features were selected for statistical analysis (2054 features). Matlab (R2021a) was used for statistical analysis (PCA, t-test) and data visualization. Isolated significant features were annotated using the online tools of Metlin, KEGG, MassTrix, YMDB database and online tools Oligonet.

2.7. Descriptive sensory analysis

In order to conduct sensorial analysis at the end of alcoholic fermentation, the three biological replicates of each Chardonnay conditions were pooled to have enough volume per sample. Once pooled, the samples were filtered and sulphited at 40mg.l⁻¹ before bottling. The samples were stored in a cellar at constant temperature for 6 months until sensory analysis.

Ten trained assessors were recruited for this study (four females and six males; median age, 40; range: 25-56). The ten assessors attended preliminary sessions to check their repeatability and their ability to recognize the typical attributes of Chardonnay wines. Sensory analyses took place in a sensory room equipped with individual boxes. Each sample was assessed in ISO standardized black glasses covered with a plastic Petri dish and coded by a three-digit random number. Thirty ml of each wine was served at room temperature. The samples were evaluated in a specific order for each panelist following a Latin square. For each sample, the assessors were asked to rate the intensity of selected attributes (Supplemental Figure S3.3) on an eight-point scale

ranging between “absent or missing” (score =0) and “very strong / very intense” (score=7). The sensory data were subjected to an ANOVA and NewmanKeuls test ($\alpha = 0.05$). Sensory statistical analyses were performed using R software (R-4.0.4).

III. Results and discussion

In this work we aimed to determine the influence of interactions between two *S. cerevisiae* yeast strains on yeast growth, fermentation kinetics, exometabolome, volatile compounds and sensory profile. Four strains were chosen since we previously reported that they possess specific metabolomic differences and lead to different wines after the alcoholic fermentation of Chardonnay must (Bordet *et al.*, 2021). Our hypothesis is that the presence of two of these strains would also lead to wines that are different from those produced by pure cultures. For better and clearer understanding, the S4S3 modality will be discussed in detail in the present paper and compared to the two other modalities.

3.1. Growth and fermentation kinetics parameters

We first investigated the impact of the co-inoculation of two strains of *S. cerevisiae* on various phenotypic traits of growth and fermentation kinetics (Table 3.3). A previous study (Bordet *et al.*, 2022) showed that the S3GFP strain and its corresponding wild type strain had identical growth and fermentation kinetics. Therefore, only the S3GFP strain will be considered in this section to follow it in coculture over time.

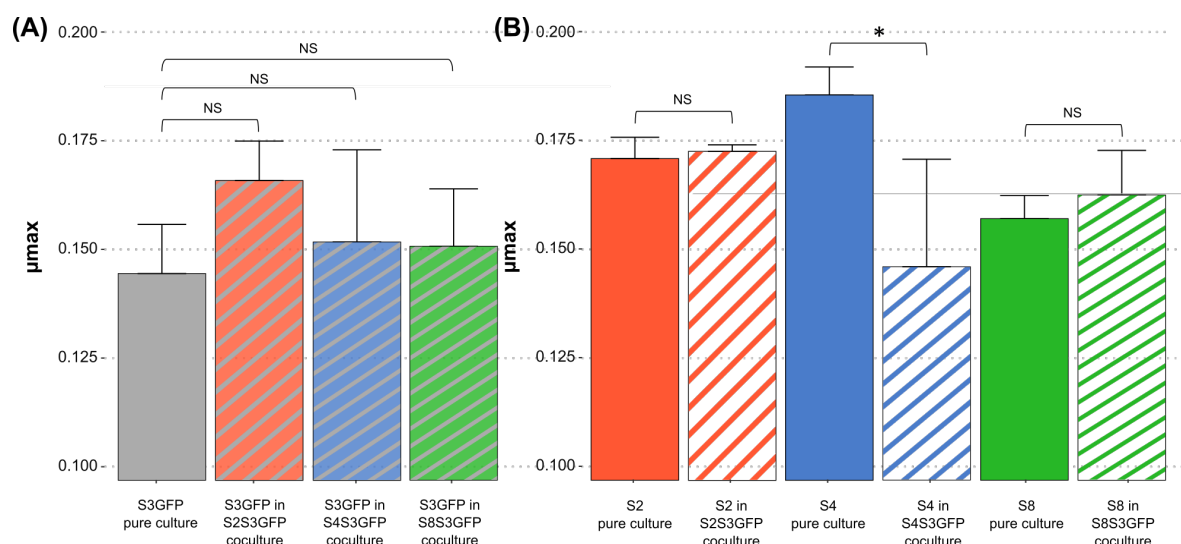


Figure 3.4: Maximum growth rate of each S. cerevisiae strain population (μ_{max}), in Chardonnay, as a function of (A) S3GFP in pure culture or in each coculture for each modality : S2S3 (Orange), S4S3 (Blue) and S8S3 (Green) and (B) S2, S4 and S8 in pure culture and in each coculture for each modality : S2S3 (Orange), S4S3 (Blue) and S8S3 (Green). μ_{max} was expressed in h⁻¹. Values correspond to the average of three biological replicates and error bars represent the standard deviation. Statistical analysis was performed between both pure culture and coculture for each strain involved (t-test, p-value < 0.05) (NS: non significant).

The maximum growth rate (μ_{max}) was determined for each strain in pure culture and coculture for each modality studied (Figure 3.4). No significant differences were

observed when comparing the μ_{max} of S3GFP in pure culture with the μ_{max} of this strain in S4S3GFP coculture. This was also observed for the two other modalities, S2S3 and S8S3. Therefore, the interactions did not impact the μ_{max} of the S3GFP strain. The μ_{max} of pure culture S4 was compared with the μ_{max} of this strain in coculture and highlighted significant differences. The interactions occurring between the two strains induced a reduction of the μ_{max} of the S4 strain in contrast to modalities S2S3 and S8S3, where this reduction was not observed, with the μ_{max} of S2 and S8 in coculture not differing for each strain in pure culture and thus with no incidence on the μ_{max} .

Table 3.3: (A) Growth and (B) fermentative kinetics parameters measured for each strain in the three modalities (S2S3, S4S3 and S8S3) in Chardonnay.

(A)

	Strain	Maximum population growth rate: μ_{max} (h ⁻¹)	Maximum population: K (viable cells.ml ⁻¹)	Generation number to reach maximum population
S2S3	S3GFP	0.144 ± 0.008	1×50.10 ⁸ ± 1.10 ⁷	6.05 ± 0.21
	S3GFP in coculture	0.166 ± 0.007] NS	7×92.10 ⁷ ± 1.10 ⁷] NS	6.54 ± 0.25] NS
	S2	0.171 ± 0.004	1×12.10 ⁸ ± 1.10 ⁶] *	6.15 ± 0.26] NS
	S2 in coculture	0.173 ± 0.001] NS	5×16.10 ⁷ ± 5.10 ⁶] *	6.06 ± 0.10] NS
S4S3	S3GFP	0.144 ± 0.008	1×50.10 ⁸ ± 1.10 ⁷] NS	6.05 ± 0.21] NS
	S3GFP in coculture	0.151 ± 0.002] NS	9×92.10 ⁷ ± 7.10 ⁶] NS	6.51 ± 0.20] NS
	S4	0.186 ± 0.005] *	1×80.10 ⁸ ± 3.10 ⁶] *	6.95 ± 0.51] *
	S4 in coculture	0.146 ± 0.019] *	4×83.10 ⁷ ± 3.10 ⁶] *	6.27 ± 0.26] *
S8S3	S3GFP	0.144 ± 0.008	1×50.10 ⁸ ± 1.10 ⁷] *	6.05 ± 0.21] NS
	S3GFP in coculture	0.150 ± 0.009] NS	9×43.10 ⁷ ± 8.10 ⁶] *	6.05 ± 0.23] NS
	S8	0.156 ± 0.004] NS	1×45.10 ⁸ ± 4.10 ⁶] *	6.69 ± 0.09] NS
	S8 in coculture	0.162 ± 0.008] NS	5×50.10 ⁷ ± 1.10 ⁷] *	6.00 ± 0.53] NS

(B)

	Strains	Maximum sugar consumption rate: V _{max} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Time to T50 of sugar degradation (hours)
S2S3	S3GFP	7.20 ± 1.00	43.3 ± 0.4
	S2	5.30 ± 0.33] NS	48.0 ± 1.3] *
	S2S3GFP coculture	5.29 ± 0.45] NS	41.3 ± 0.4] NS
S4S3	S3GFP	7.20 ± 1.00	43.3 ± 0.4
	S4	2.92 ± 0.36] *	42.0 ± 0.0] NS
	S4S3GFP coculture	5.43 ± 0.23] *	41.0 ± 0.7] NS
S8S3	S3GFP	7.20 ± 1.00	43.3 ± 0.4
	S8	6.53 ± 0.50] NS	50.3 ± 0.4] *
	S8S3GFP coculture	5.57 ± 0.20] NS	42.7 ± 0.4] NS

Values correspond to the average of three biological replicates \pm standard deviation. Statistical analysis was performed between both strains in single culture and coculture (t-test, p-value ≤ 0.05) (significant different, NS: no significant).

μ_{\max} values were used to calculate the fitness advantage (m) of strains in coculture. The m value for the S4S3 modality was close to zero and slightly negative ($m = -0.04$) for S4 vs S3GFP, indicating similar fitness for both strains in the co-culture. This was also noted for the S2S3 and S8S3 modalities, with an m of 0.00 and 0.01 respectively.

Considering the maximum population K (Table 3.3.A), the addition of the two maximum populations of the two strains S4 and S3GFP in the coculture is the same as each associated pure culture, *i.e.* 1.50×10^8 viable cells.ml⁻¹. However, at the mid-fermentation stage, the population of S4 was half that of S3GFP (Supplemental Figure 3.4). This modulation of the population could be due to a change in nutrient uptake, particularly of nitrogen. This has been reported in studies that quantified nutrient sources over time and gene expression in pure and co-cultures of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* (Barbosa *et al.*, 2015; Ruiz *et al.*, 2020). In addition, cell-cell contact could explain a modification of this assimilation (Yashiroda & Yoshida, 2019). Similar growth kinetics were observed for the S2S3 and S8S3 modalities when comparing pure cultures and cocultures. Furthermore, the co-cultured strains exhibited equivalent populations during alcoholic fermentation, supporting neutral interactions.

It was also possible to determine the number of generations to reach this maximum population (Table 3.3.A). The S4 strain displayed a significantly different number of generations to reach its maximum population of 6.95 and 6.27, when considering the pure culture vs. the coculture, respectively. Indeed, the S4 strain was apparently slightly affected in its development within the coculture. Therefore, minor detrimental interactions for S4 could explain this modulation of growth. Contrary to the S2S3 and S8S3 modalities, no difference was observed, indicating that the interactions were neutral.

All the fermentations carried out in Chardonnay must led to a similar ethanol concentration. We also compared the fermentation kinetics of the pure cultures and the cocultures according to two parameters: the maximum rate of sugar degradation and the time to degrade 50% of the initial fermentable sugars. Therefore, indeed, it is not possible to dissociate the two strains within the coculture. Thus, the V_{\max} and T50 of each pure cultures were compared to the V_{\max} and T50 of the associated coculture.

We showed that only the S4S3 co-culture showed a significant difference in V_{\max} compared to the S4 strain in pure culture. For all the other strains, no difference in V_{\max} was found when considering the pure and co-cultures. However, if we examine the data, it appeared that the V_{\max} value ($5.43 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) of the coculture was an intermediate of the V_{\max} of S4 and S3GFP in pure culture and did not differ significantly from the average of the latter ($5.06 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) as described previously for the co-inoculation of non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* (Harlé *et al.*, 2020; Renault *et al.*, 2016). Therefore, interactions between two *S. cerevisiae* strains did not affect V_{\max} . The

time to degrade 50% of the initial fermentable sugars (T50) was found to be not significantly different if we consider the pure culture of the S4 strain and the coculture, like for the S8S3 modality. It was therefore observed that the T50 was not negatively impacted by the interactions for these two modalities. On the contrary, for the S2S3 modality, the average of the T50 values of the two strains in culture (45.65 hours) was significantly higher than the T50 of the coculture (41.33 hours). Thus, combined with the Vmax observations, there was a slowdown in the consumption of sugars during the early stages of fermentation.

The presence of two *S. cerevisiae* strains and the interactions that may occur between them did not confer a fitness advantage to either of the strains present. However, these interactions could induce a modulation of the population, like for the S4S3 modality. Interactions were shown to be strain dependent and confirmed previous observations (Wang et al., 2015). Moreover, it was shown that the fermentation kinetics were not affected by the interactions. However, it is interesting to note that despite interactions that appear neutral at this scale, they can induce a modification of yeast metabolism. Thus, we were interested in assessing the impact of these interactions on the volatile composition of wines.

3.2. [Volatilome analysis](#)

The volatilome of wines from pure cultures and cocultures was analyzed. The concentration of 67 volatile compounds determined by GC-FID or GC-MS is reported in Supplementary Table S3.1.

Volatile compounds detected in pure and coculture wines for each modality were discriminated using Principal Component Analysis (PCA) (Figure 3.5.A). These projections were able to separate the pure culture fermentations from the coculture fermentations for each modality. Regarding the S4S3 modalities, the PCA axis 1 allowed discriminating pure cultures from the related cocultures, explaining 45.6% of the variability data. Axis 2 further discriminated between the two cultures of the S3 and S4 strains according to 20.9% variability of the data. Modality S8S3 showed the same trends. However, this was not the case for the S2S3 modality, where axis 1 discriminated the coculture from S3 in pure culture and axis 2 the coculture from the S2 pure culture. Therefore, the volatile composition of the S2S3 coculture was not revealed as an intermediate between the two single strains composing it but had a profile closer to S2. These results suggested that the S2 strain contributed significantly to the volatilome composition of the S2S3 coculture.

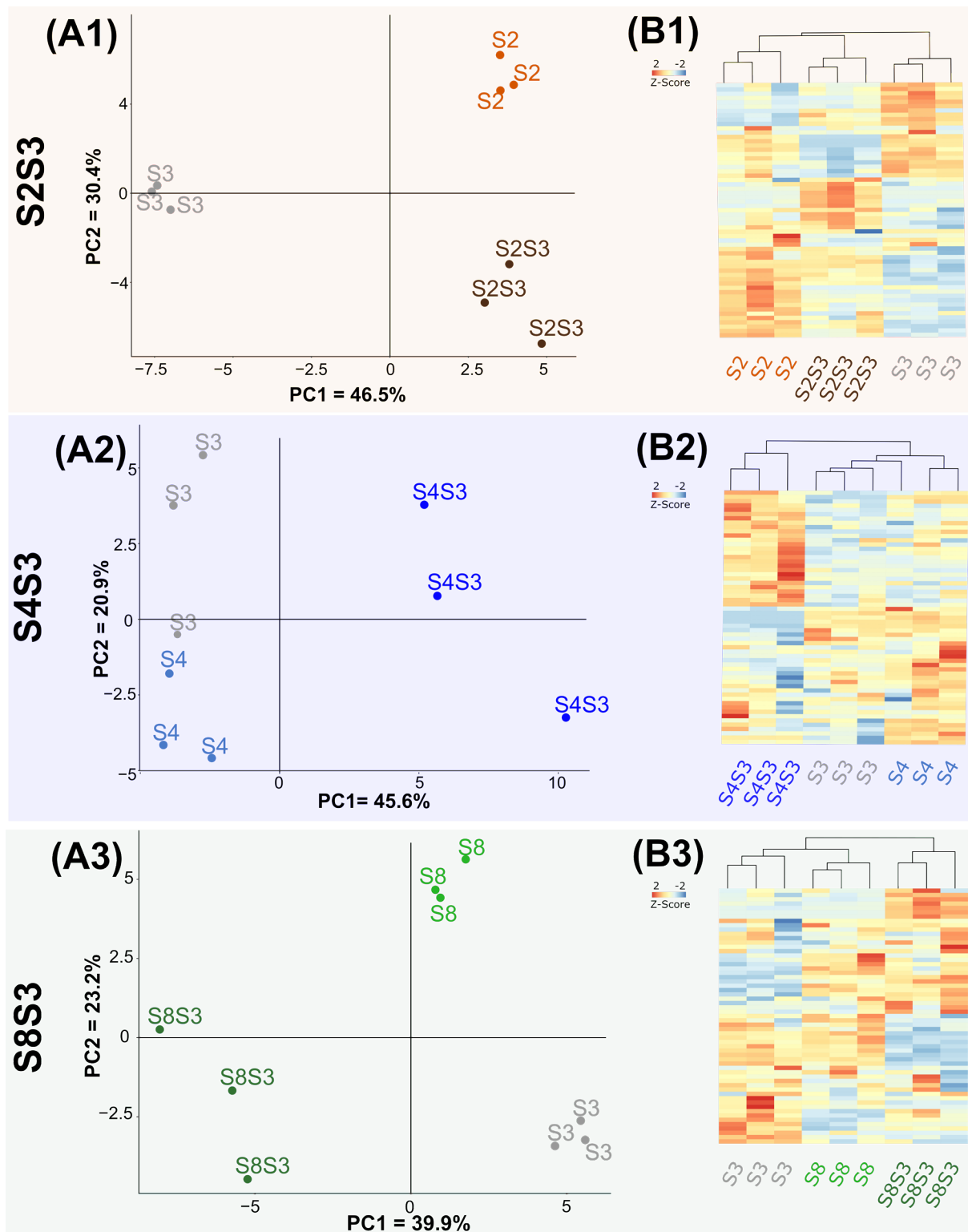


Figure 3.5: Volatilome analysis (A) PCA of data of Chardonnay wines from pure cultures and coculture for each modality S2S3 (orange), S4S3 (blue), S8S3 (green). (B) HCA representing different compounds in pure cultures and cocultures.

One-way ANOVA and then a Tukey HSD test were performed to assess volatile composition differences between the pure culture and co-culture within each

modality. Compounds that displayed significant differences between pure cultures and cocultures were plotted on HeatMaps (Figure 3.5.B). Modality S4S3 displayed 33 compounds out of 67, showing significant concentration differences between the two pure cultures and the associated coculture. Out of these 33 compounds, 4 belonged to the ester family, 7 were phenols and 6 were part of the fatty acids family. Amino acids and nitrogen compounds are known to be precursors of volatile organic compounds such as acetate esters and therefore involve nitrogen metabolism in this synthesis. Thus, a modulation of the concentration of esters could indicate an impact of interactions on nitrogen metabolism and or central carbon metabolism. In addition, interestingly, a significant increase of three fatty acids was found in the same wine. Overexpression of these two compounds families in S4S3 coculture could be related to lipid metabolism, which is also involved in esters synthesis, as described by Saerens *et al.*, 2008. A third family of volatile compounds, i.e. phenols, was impacted during the culture of the two strains. An increase in these compounds was noted for all three modalities, S4S3, S2S3 and S8S3. Thus a variation of the enzymatic activity of decarboxylase (Belda *et al.*, 2017; Loscos *et al.*, 2007), leading to the decarboxylation of phenolic acids into vinyl phenols, could be induced by the interactions.

To go further, only the discriminant compounds with an Odour Activity Value reported in Supplementary Table S3.2 were considered. Of these compounds, hexanoic acid, octanoic acid and acetic acid were detected to have higher concentrations when the two strains, S4 and S3, were brought together. Acetic acid concentration could be modulated by a modification of gene expression. Indeed, Sadoudi *et al.*, 2012 revealed that there was an increase in gene expression in *S. cerevisiae*, encoding enzymes involved in pyruvate dehydrogenase bypass and leading to a modulation of acetic acid concentration in co-culture with *M. pulcherrima* (Sadoudi *et al.*, 2012). Octanoic acid was also overproduced by coculture in the S2S3 modality. This saturated acid is known to be involved in fruity notes (Lambrechts & Pretorius, 2000) but mainly as an intermediate of fatty acid ethyl esters (Swiegers *et al.*, 2005). O₂ deficiency, which can be induced during co-culture by competition between yeasts, has been described as leading to the inhibition of fatty acid synthesis combined with an accumulation of MCFAs (Dufour *et al.*, 2003). Furthermore, these MCFAs were described to be toxic to yeast. Furthermore, modality S4S3 showed only 2 and 5 compounds with a similar concentration to strain S4 and S3 in pure culture, respectively, while the other compounds showed significantly different concentrations for the co-culture, which confirmed the modification of the volatilome by the interactions within the cocultures initially revealed by the PCA. Thus, the slightly higher S3 population within the coculture could contribute more to the volatile chemical profile.

β -ionone, norisoprenoïd compounds and γ -decalactone were found to be significantly less present in the S4S3 coculture than for the S2S3 and S8S3 modalities. These aromatic compounds were found as non-volatile, odorless precursors on the grape berry and can be released by enzymatic activity by yeasts like *S. cerevisiae*

(Loscos et al., 2010; Tempere et al., 2011). α -arabinofuranosidase, α -rhamnosidase and β -glucosidase activities were reported for *S. cerevisiae* species according to the precursors present in the must (Sarry & Gunata, 2004; Ugliano et al., 2006). Therefore, co-inoculation could impact enzymatic activity, allowing the release of the compounds. This was shown for the release and modulation mechanisms of thiols (Anfang et al., 2009; Howell et al., 2006; Swiegers et al., 2005; Zott et al., 2011) and could be effective for the enzymes involved in the release of these volatile compounds. In addition, it has been suggested that the content of nitrogenous compounds would also impact norisoprenoid compound release (Vilanova et al., 2012). Moreover, modality S8S3 contained very few significant volatile compounds, with concentrations above the perception threshold, different from the pure and cocultures, indicating that interactions between S8 and S3 had no impact on the composition of the odor active volatilome. Finally, for the S2S3 modality most compounds were exhibited at concentrations equivalent to those of the S2 strain in pure culture. This observation is in agreement with the PCA for the S2S3 modality, while the S2 population in the coculture was equivalent to the S3 population. Therefore, considering population dynamics in cocultures, these results indicated that volatile composition cannot be explained by population dynamics but rather through interactions.

We observed a modulation of the volatile aroma composition under coculture compared to pure cultures, since there was no variation in the population except for the S4S3 modality. This change in the composition of the volatilome was indeed due to interactions. These changes in the volatilome suggest a modification of the aromatic profile of the wines. The sensory profile of end wines is a major issue, but very few studies have been conducted at this scale. Therefore, in this integrative approach, we wanted to evaluate the sensory impact of co-inoculation of two *S. cerevisiae* strains on Chardonnay wine. In addition, we integrated the mix with a 50/50 ratio (v/v) of post alcoholic fermentation wines of the two pure cultures, equivalent to a blend of wines associated with the coculture for each of the modalities by comparing it with the cocultures, in order to confirm the presence and type of interactions.

3.3. [Sensory analysis](#)

At the end of alcoholic fermentation, the wines from the biological replicates of each condition were pooled, sulfited, filtered, bottled, and stored for six months. The intensities of each attribute were computed for each sample to determine sensory profiles. Figure 3.6 shows the average scores for each attribute and each sample for S2S3, S4S3 and S8S3 modalities separately. Regarding the S4S3 modality, it was notable that the S4S3 coculture was distinct from the associated pure cultures. Thus, the S4S3 mix was found to be very different from the coculture, confirmed by their separation according to axis 1 of the biplot (Supplemental Figure S3.5). Once again, this confirmed the existence of interactions between the two strains in the co-inoculation process, which in addition modulated the sensory profile of the wines.

The intensity of the oxidative dimension with oxidation and candied fruit attributes was reduced for the S4S3 modality in the cocultures compared to the pure cultures and the mix. Thus, in our study, the interaction phenomena would lead to reducing the oxidative dimension of wines. It is interesting to note that the intensity of floral attributes decreased for the coculture, possibly correlating with the decrease of β -ionone synthesis which participates in this characteristic (Loscos *et al.*, 2010). As described previously, isoamyl acetate synthesis participates in bestowing amyl attributes to the S2S3 and S4S3 modalities. On the other hand, methionol concentration in co-inoculating wine participates in reducing this attribute.

For modality S8S3, the coculture appeared to be very close to the mix according to the location on the same side of axis 1 of the CA biplot, which could confirm the presence of neutral interactions or the lack of interactions. For the S2S3 modality, significantly different attributes were found between the wines from pure culture fermentations rather than the coculture or the mix. Also, regarding the coculture and the mix, the amyl attribute and oxidation were intermediate in intensity in relation to the pure cultures. The S2 strain in pure culture was also very close to the coculture, which we observed for the other aspects of the study except for polish and amyl. The coculture thus seemed to compensate for the oxidative aspect of the S3 strain.

For all the modalities, the mixes did not reflect an intermediate profile between those of the two strains taken separately. This may be explained by interactions between different volatile compounds and human physiology biases.

Thus, we were able to show that the interactions occurring between two *S. cerevisiae* strains led to a modulation of the aromatic profile of wines. Indeed, the wines resulting from the coculture appeared different from the mixes and the wines resulting from the pure cultures. Interactions can therefore lead to an interesting modulation of the aromatic profiles of wines. Moreover, the changes observed at the secondary metabolism level, associated with the modification of the volatilome composition, suggest that the primary metabolism would also be affected by the interactions. Therefore, we aimed to use non-targeted metabolomics to report the metabolic changes and describe the types of interactions that took place between two strains of *S. cerevisiae*.

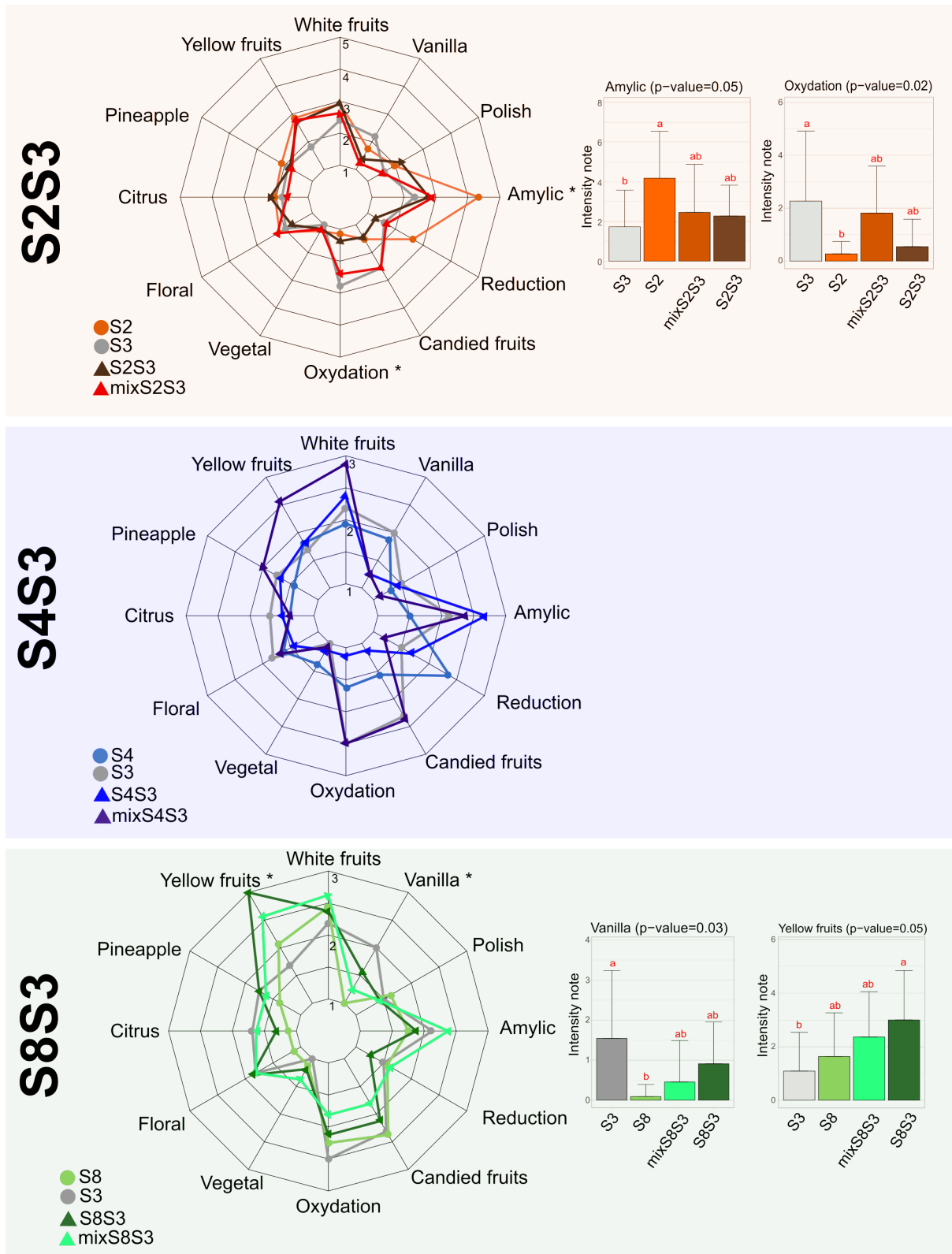


Figure 3.6: (A) Sensory profiles of Chardonnay wines from pure cultures, corresponding cocultures and post-alcoholic fermentation mixes for each modality S2S3 (orange), S4S3 (blue) and S8S3 (green). (B) Histogram of score intensity for attributes showing significant differences (Newman Keuls test, $p\text{-value} \leq 0.05$) between the four wines studied by modality. For modality S4S3 no attribute was significantly different between the different conditions.

3.4. Non volatile metabolome analysis

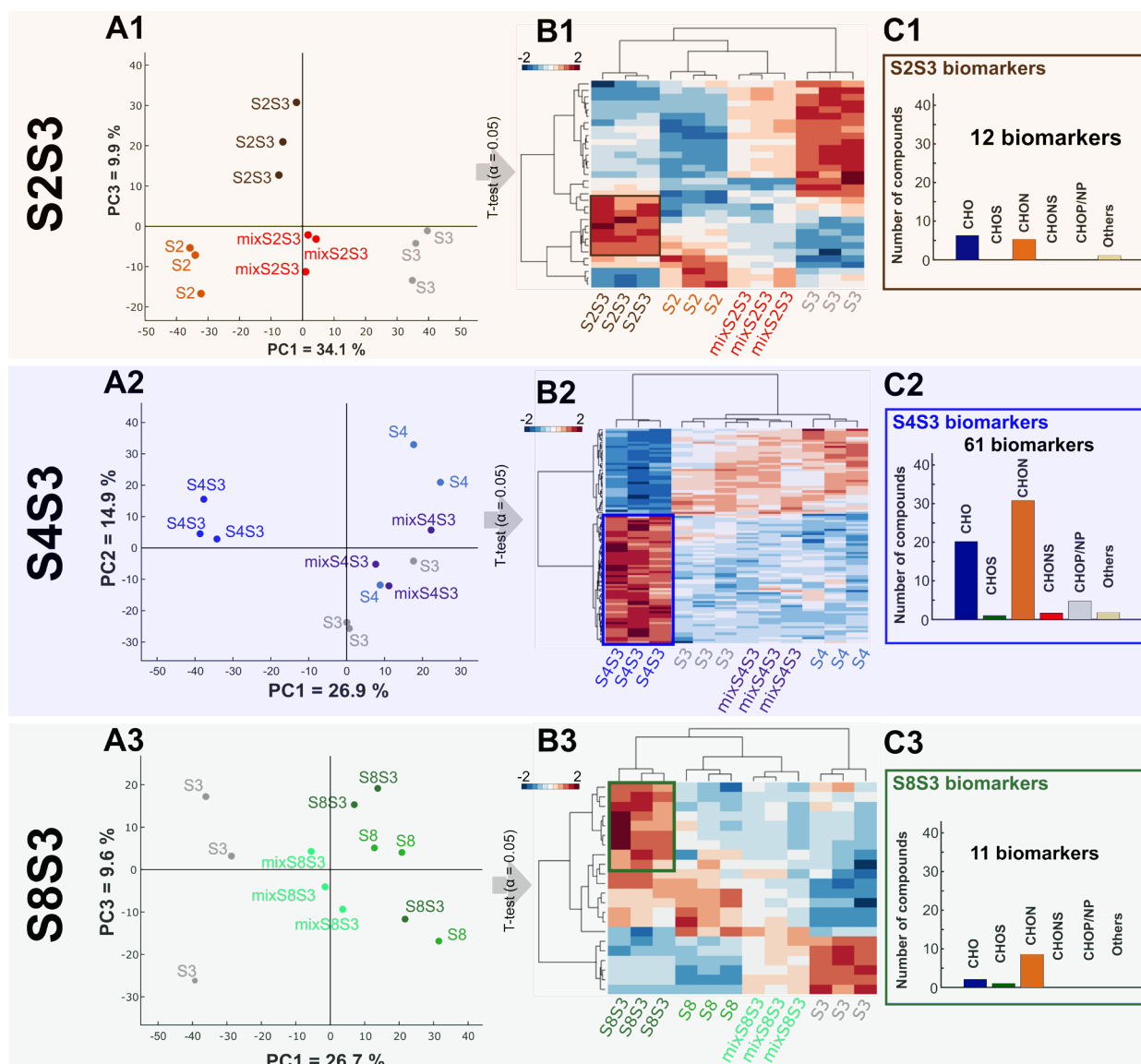


Figure 3.7: UPLC-Q-TOF-MS data (A) PCA of data of pure cultures, coculture and post-alcoholic single fermentation Chardonnay wine mixes for each modality S2S3 (orange), S4S3 (blue), S8S3 (green). (B) HCA representing extracted significantly different compounds, assessed by t-test (p -value <0.05), in pure cultures, cocultures and mixes. (C) Histogram proportions of elemental compositions of significantly more intense biomarkers of each coculture.

Chardonnay wine compositions were analyzed by LC-q-TOF-MS. Detected features were extracted from the complete dataset of all the modalities in both positive and negative ionization modes. Of these, the unique masses were excluded for further data processing, resulting in 2054, 2054 and 2637 features retained for modalities S2S3, S4S3 and S8S3, respectively. Putative annotation was assigned for each extracted feature using an online database (Metlin, KEGG) and the online tool Oligonet. Only features with a putative annotation (annotation Level 3) were retained for subsequent data processing.

Principal component analysis (PCA) was performed on LC-q-TOF-MS data for each modality (Figure 3.7.A). All of these representations confirmed the close proximity of biological replicates for a given sample. For each modality, mix samples were localized between the two associated pure cultures, indicating an intermediate composition in pure cultures. Mixes therefore corresponded chemically to a 50/50 ratio of wines from pure culture yeast fermentations.

Regarding modality S4S3, the coculture was separated from the pure cultures according to PCA Axis 1, explaining 26.9 % of the variability data. This significant separation supported the previously observed interactions between the two strains S3 and S4 within the coculture. This scheme was also found for the S2S3 modality. Conversely, for modality S8S3 the coculture was found to be confounded with the pure culture S8 on the right side of PCA axis 1. For all the modalities, co-cultures were considerably discriminated from the mixes following axis 1 for modalities S4S3 and S8S3 and following axis 2 for modality S2S3. Thus, the non-targeted metabolomic study highlighted that these mixes appeared to be different from the cocultures and confirmed interaction mechanisms. Moreover, as observed previously, the impact of the presence of two strains of *S. cerevisiae* varied according to the strain associated with S3.

T-tests ($\alpha = 0.05$) were performed on masses associated with putative annotation (Level 3) for each modality. Putative annotations that displayed significant differences of intensity within each modality were extracted and considered as biomarkers. Of these, 101 were found for modality S4S3, while 32 and 22 were recovered for modalities S2S3 and S8S3, respectively. Thus, there were more differences in the S4S3 modality than for the other modalities, which is consistent with phenotypic and volatile compound synthesis aspects. A Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and a HeatMap of all the biomarkers were established for each modality (Figure 3.7.B). The coculture was recovered differed from the other conditions, as revealed by the HCA. On the other hand, according to the volatile compound analysis, as shown by the HCA, we noticed that the S2S3 coculture was closer to the S2 pure culture than the S3 pure culture.

Histogram proportions of elemental compositions of significantly more intense biomarkers of each coculture of the respective modality were established. The significant more intense biomarkers were mostly CHON and CHO compounds for the S4S3 coculture, like for the S8S3 modality, while CHO compounds were more frequent for the S2S3 modality.

LC-MS/MS analysis was performed to confirm the structure of annotated compounds and refine compound identification. Considering the S4S3 modality, among the 101 biomarkers highlighted associated with putative annotation, 66 were fragmented and 28 annotated according to the Metlin database which allows the annotation of metabolites according to their mass and associated fragments from MS/MS analysis (Table 3.4). Out of these 28 compounds (Supplemental Table S3.5), 3 were identified

using the standard comparison. Leucine was found to be more intense for the S3 pure culture while catechin and quercetin-3-O-glucopyranoside were significantly increased for the co-culture.

Table 3.4: Table of extracted, annotated and identified metabolites of Chardonnay wine fermented by each single strain, coculture or strains mixed for each modality S2S3 (orange), S4S3 (blue), S8S3 (green).

Modalities	Number of biomarkers with tentative structure (Level 3)	Fragmented biomarkers	Fragmented biomarkers (putative identification, Level 2)	Validated Identification (Level 1)
S2	3	2	1	-
S3	17	13	2	-
mixS2S3	-	-	-	-
S2S3	12	11	7	-
S4	19	13	4	-
S3	21	15	6	1
mixS4S3	-	-	-	-
S4S3	61	38	18	2
S8	5	5	3	-
S3	6	5	3	-
mixS8S3	-	-	-	-
S8S3	11	10	5	-

Although 3 compounds could be identified, fragmentation allowed us to replace biomarkers in the associated metabolic pathways. The annotated biomarkers were grouped into 18 metabolic pathways, classically described in *S. cerevisiae*, for the co-culture of the S4S3 modality. We observed that most of the biomarkers were linked to pathways of amino acid metabolism, such as tryptophan and phenylalanine metabolism. Indeed, 8 of these 18 pathways involved in exometabolome changes were associated with this nitrogen metabolism for the S4S3 coculture. The latter was a major contributor of interaction phenomena. This result confirms a previous study which used a metabolomic approach to reveal the redistribution of fluxes through the central nitrogen metabolism occurring as part of interactions between *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts (Roullier-Gall et al., 2021). The significance of nitrogen was observed previous using other approaches such as genomics and transcriptomics and reported by Comitini et al., 2021. Curiel et al., 2017, reported an increase of gene expression under control with Nitrogen Catabolism Repression and also genes involved in the utilization of alternative nitrogen sources during the mixed culture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*. On the other hand, for a coculture of *Saccharomyces kudriavzevii* and *S. cerevisiae*, an increase in the expression of genes involved in the uptake of nitrogenous compounds from the surrounding environment in the *S. kudriavzevii* strain was demonstrated to respond to competition for nutrient uptake by *S. cerevisiae* (Alonso-del-Real et al., 2019).

In addition, the overexpression of amino acid catabolic intermediates such as phenyl-acetaldoxime was observed for S4S3 coculture, suggesting that as a result of competition for preferential nitrogen compounds, AAs may be catabolized to substitute them. Moreover, they were no longer available for the synthesis of volatile compounds such as higher alcohols and associated esters.

Of the S4S3 coculture biomarkers, 30 annotated biomarkers were putatively identified as peptides according to a significant increase in their concentration. During stress situations, including the presence of other microorganisms, significant modifications of protein synthesis are established, inducing an increase in protein production that may be subjected to hydrolysis releasing peptides (Pereira *et al.*, 2021). In addition, the S4 strain has been described as undergoing early autolysis, inducing the release of nitrogenous compounds including peptides (del Barrio-Galán *et al.*, 2016). Also, it is possible that this autolysis is stimulated by the presence of another strain.

High resolution mass spectrometry revealed the modification of the main metabolism related to interactions. It also provided information on the nature of the interactions as non-neutral except for the S8S3 modality. The coculture exometabolome was revealed as not being a simple addition of two metabolomes however as strain dependent. This was supported by the pattern of the S2S3 modality where the coculture appeared more like the S2 strain in pure culture. The latter would therefore make a significant contribution to the exometabolome of the coculture despite the absence of population variation.

IV. Conclusion

Most interaction studies have focused on interactions between *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts according to classical approaches in order to modulate aromatic profile of wine. Here we aimed to characterize *S. cerevisiae* interactions and their impact on wine by taking an integrative approach. Based on growth parameters, the majority of the strains were not affected by the interactions. On the other hand, despite different behaviors at the microbiological level, the association of two *S. cerevisiae* strains still induced a modulation of yeast metabolism and of the sensory profile of the wines. Up to thirty volatile compounds were significantly different between the co-culture and the associated pure cultures, including 18 relevant wine aroma compounds. Overexpression of linear ethyl esters and corresponding fatty acids was observed. Higher alcohols (including methionol), their related acetates were affected by coculture. Also, remarkable overexpression of small amounts of volatiles phenols families was noticed. Co-culture makes it possible to obtain completely new aromatic expressions that do not exist in the original pure cultures attributed to yeast interactions. The sensory profiles of the co-cultures were found to differ from those of the pure cultures regardless of the strain associated with S3. Oxidative dimension was reduced for two cocultures modalities compared to the pure cultures and the mix. Isoamyl acetate synthesis participates in bestowing amylic attributes. Based on the

exometabolome, the cocultures were revealed as not being simple additions of two wines represented by mixes, thereby highlighting complex interactions. Thousands of compounds made it possible to pinpoint distinctions within each modality. Coculture were characterized with significantly more intense CHO and CHON compounds compared to the pure cultures and the associated mix. The latter, involved in the relevant central nitrogen metabolism, allowed highlighting metabolic pathways associated with the interactions, including mostly amino acid metabolism pathways. Indeed, metabolomics makes it possible to refine the overview of the modifications induced by the previously observed interactions at the phenotypic level and from the sensory perspective. The modulation of the aromatic and chemical profile of wines by interactions between two *S. cerevisiae* strains without altering fermentative properties offers the possibility of using mixed *S. cerevisiae* yeasts to modulate the profile of wines. Indeed, classical approaches such as monitoring of the populations over time are not therefore sufficient to determine and describe the type of interactions that occur. A comprehensive approach by combining different techniques is required to understand them.

V. Références

- Alonso-del-Real, J., Pérez-Torrado, R., Querol, A., & Barrio, E. (2019). Dominance of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains over *S. kudriavzevii* in industrial fermentation competitions is related to an acceleration of nutrient uptake and utilization. *Environmental Microbiology*, 21(5), 1627-1644. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14536>
- 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), 1-8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x>
- Bagheri, B., Bauer, F. F., & Setati, M. E. (2017). The Impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a Wine Yeast Consortium in Natural and Inoculated Fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01988>
- Balikci, E. K., Tanguer, H., Jolly, N. P., & Erten, H. (2016). Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation: *Lachancea thermotolerans* affects wine fermentation. *Yeast*, 33(7), 313-321. <https://doi.org/10.1002/yea.3166>
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243-259. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- 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(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0318-1>
- Barbosa, C., Mendes-Faia, A., & Mendes-Ferreira, A. (2012). The nitrogen source impacts major volatile compounds released by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.003>
- Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., & Moreno-Arribas, M. (2017). Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules*, 22(2), 189. <https://doi.org/10.3390/molecules22020189>
- Binati, R. L., Innocente, G., Gatto, V., Celebrin, A., Polo, M., Felis, G. E., & Torriani, S. (2019). Exploring the diversity of a collection of native non-*Saccharomyces* yeasts to develop co-starter cultures for winemaking. *Food Research International*, 122, 432-442. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.043>
- Bordet, F., Joran, A., Klein, G., Roullier-Gall, C., & Alexandre, H. (2020). Yeast-Yeast Interactions : Mechanisms, Methodologies and Impact on Composition. *Microorganisms*, 8(4), 600. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040600>
- Bordet, F., Roullier-Gall, C., Ballester, J., Vichi, S., Quintanilla-Casas, B., Gougeon, R. D., Julien-Ortiz, A., Kopplin, P. S., & Alexandre, H. (2021). Different Wines from Different Yeasts? “*Saccharomyces cerevisiae* Intraspecies Differentiation by Metabolomic Signature and Sensory Patterns in Wine”. *Microorganisms*, 9(11), 2327. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112327>
- 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(2), 485-492. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.001>
- Ciani, M., Canonico, L., Oro, L., & Comitini, F. (2020). Footprint of Nonconventional Yeasts and Their Contribution in Alcoholic Fermentations. In *Biotechnological Progress and Beverage Consumption* (p. 435-465). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816678-9.00014-X>
- Ciani, M., & Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science*, 1, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.07.001>
- Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., & Ciani, M. (2021). Yeast Interactions and Molecular Mechanisms in Wine Fermentation : A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7754. <https://doi.org/10.3390/ijms22147754>
- Conacher, C. G., Naidoo-Blassoples, R. K., Rossouw, D., & Bauer, F. F. (2020). Real-time monitoring of population dynamics and physical interactions in a synthetic yeast ecosystem by use of multicolour flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(12), 5547-5562. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10607-x>
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Evaluation of Non-*Saccharomyces* Yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1670-1678. <https://doi.org/10.1128/AEM.03780-13>
- Curiel, J. A., Morales, P., Gonzalez, R., & Tronchoni, J. (2017). Different Non-*Saccharomyces* Yeast Species Stimulate Nutrient Consumption in *S. cerevisiae* Mixed Cultures. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02121>
- del Barrio-Galán, R., Medel-Marabolí, M., & Peña-Neira, Á. (2016). Effect of different ageing techniques on the polysaccharide and phenolic composition and sensorial characteristics of Chardonnay white wines fermented with different selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *European Food Research and Technology*, 242(7), 1069-1085. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2612-x>

- Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Outlining a future for non- *Saccharomyces* yeasts : Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 170-180. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.020>
- Englezos, V., Cachón, D. C., Rantsiou, K., Blanco, P., Petrozziello, M., Pollon, M., Giacosa, S., Río Segade, S., Rolle, L., & Coccolin, L. (2019). Effect of mixed species alcoholic fermentation on growth and malolactic activity of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7687-7702. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10064-1>
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Pollon, M., Fracassetti, D., Ortiz-Julien, A., Gerbi, V., Rolle, L., & Coccolin, L. (2018). Volatile profile of white wines fermented with sequential inoculation of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 257, 350-360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.018>
- Escribano, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, A. R. (2018). Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non- *Saccharomyces* species and clones. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1521-1531. <https://doi.org/10.1111/jam.13735>
- Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11-22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)
- 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>
- Harlé, O., Legrand, J., Tesnière, C., Pradal, M., Mouret, J.-R., & Nidelet, T. (2020). Investigations of the mechanisms of interactions between four non-conventional species with *Saccharomyces cerevisiae* in oenological conditions. *PLOS ONE*, 15(5), e0233285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233285>
- Howell, K. S., Cozzolino, D., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H., & Henschke, P. A. (2006). Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. *FEMS Yeast Research*, 6(1), 91-101. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00010.x>
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10829-10837. <https://doi.org/10.1021/jf801695h>
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its Importance to Wine Aroma—A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21, 33.
- López, R., Aznar, M., Cacho, J., & Ferreira, V. (2002). Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 966(1-2), 167-177. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00696-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00696-9)
- Loscos, N., Hernandez-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Release and Formation of Varietal Aroma Compounds during Alcoholic Fermentation from Nonfloral Grape Odorless Flavor Precursors Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6674-6684. <https://doi.org/10.1021/jf0702343>
- Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2010). Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varieties during accelerated wine ageing. *Food Chemistry*, 120(1), 205-216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.008>
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., Gaggero, C., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*, 141(3), 2513-2521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.056>
- Mencher, A., Morales, P., Curiel, J. A., Gonzalez, R., & Tronchoni, J. (2021). *Metschnikowia pulcherrima* represses aerobic respiration in *Saccharomyces cerevisiae* suggesting a direct response to co-cultivation. *Food Microbiology*, 94, 103670. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103670>
- Morales, M. L., Fierro-Risco, J., Ríos-Reina, R., Ubeda, C., & Paneque, P. (2019). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* co-inoculation on volatile profile in fermentations of a must with a high sugar content. *Food Chemistry*, 276, 427-435. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.041>
- Nardi, T., Panero, L., Petrozziello, M., Guaita, M., Tsolakis, C., Cassino, C., Vagnoli, P., & Bosso, A. (2019). Managing wine quality using *Torulaspora delbrueckii* and *Oenococcus oeni* starters in mixed fermentations of a red Barbera wine. *European Food Research and Technology*, 245(2), 293-307. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3161-x>
- Nisiotou, A., Sgouros, G., Mallouchos, A., Nisiotis, C.-S., Michaelidis, C., Tassou, C., & Banilas, G. (2018). The use of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* strains as a tool to create chemical complexity in local wines. *Food Research International*, 111, 498-508. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.035>
- Ortega, C., López, R., Cacho, J., & Ferreira, V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds.

- Journal of Chromatography A*, 923(1-2), 205-214. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00972-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00972-4)
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Metabolomics : The apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 263-269. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- Peng, C., Andersen, B., Arshid, S., Larsen, M. R., Albergaria, H., Lametsch, R., & Arneborg, N. (2019). Proteomics insights into the responses of *Saccharomyces cerevisiae* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Lachancea thermotolerans*. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(9). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz126>
- Pereira, C., Mendes, D., Dias, T., Garcia, R., da Silva, M. G., & Cabrita, M. J. (2021). Revealing the yeast modulation potential on amino acid composition and volatile profile of Arinto white wines by a combined chromatographic-based approach. *Journal of Chromatography A*, 1641, 461991. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461991>
- Petitgonnet, C., Klein, G. L., Roullier-Gall, C., Schmitt-Kopplin, P., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Julien-David, D., & Alexandre, H. (2019). Influence of cell-cell contact between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* on yeast interactions and the exo-metabolome. *Food Microbiology*, 83, 122-133. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.005>
- Pinu, F. (2018). Grape and Wine Metabolomics to Develop New Insights Using Untargeted and Targeted Approaches. *Fermentation*, 4(4), 92. <https://doi.org/10.3390/fermentation4040092>
- 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., Coulon, J., Moine, V., Thibon, C., & Bely, M. (2016). Enhanced 3-Sulfanylhexasan-1-ol Production in Sequential Mixed Fermentation with *Torulasporea delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Situation of Synergistic Interaction between Two Industrial Strains. *Frontiers in Microbiology*, 7, 293. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00293>
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., & Divol, B. (2018). Altered Fermentation Performances, Growth, and Metabolic Footprints Reveal Competition for Nutrients between Yeast Species Inoculated in Synthetic Grape Juice-Like Medium. *Frontiers in Microbiology*, 9, 196. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00196>
- Roullier-Gall, C., Bordet, F., David, V., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2021). Yeast interaction on Chardonnay wine composition : Impact of strain and inoculation time. *Food Chemistry*, 131732. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131732>
- Roullier-Gall, C., David, V., Hemmler, D., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2020). Exploring yeast interactions through metabolic profiling. *Scientific Reports*, 10(1), 6073. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63182-6>
- Ruiz, J., de Celis, M., de Toro, M., Mendes-Ferreira, A., Rauhut, D., Santos, A., & Belda, I. (2020). Phenotypic and transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation in response to nitrogen nutrition and co-inoculation with *Torulasporea delbrueckii*. *Food Research International*, 137, 109663. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109663>
- 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(2), 243-253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 454-461. <https://doi.org/10.1128/AEM.01616-07>
- Sarry, J., & Gunata, Z. (2004). Plant and microbial glycoside hydrolases : Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry*, 87(4), 509-521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.003>
- Scott, W. T., van Mastrigt, O., E. Block, D., A. Notebaart, R., & J. Smid, E. (2021). Nitrogenous Compound Utilization and Production of Volatile Organic Compounds among Commercial Wine Yeasts Highlight Strain-Specific Metabolic Diversity. 9(1), 19.
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 1145-1159. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4>
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139-173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
- Tempere, S., Cuzange, E., Malak, J., Bougeant, J. C., de Revel, G., & Sicard, G. (2011). The Training Level of Experts Influences their Detection Thresholds for Key Wine Compounds. *Chemosensory Perception*, 4(3), 99-115. <https://doi.org/10.1007/s12078-011-9090-8>
- Tronchoni, J., Curiel, J. A., Morales, P., Torres-Pérez, R., & Gonzalez, R. (2017). Early transcriptional response to biotic stress in mixed starter fermentations involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii*. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.017>

Ugliano, M., Bartowsky, E. J., McCarthy, J., Moio, L., & Henschke, P. A. (2006). Hydrolysis and Transformation of Grape Glycosidically Bound Volatile Compounds during Fermentation with Three *Saccharomyces* Yeast Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6322-6331. <https://doi.org/10.1021/jf0607718>

Vilanova, M., Siebert, T. E., Varela, C., Pretorius, I. S., & Henschke, P. A. (2012). Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. *Food Chemistry*, 133(1), 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.082>

Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Åkesson, M., Smedsgaard, J., & Nielsen, J. (2005). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(5), 613-646. <https://doi.org/10.1002/mas.20032>

Wang, C., García-Fernández, D., Mas, A., & Esteve-Zarzoso, B. (2015). Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01156>

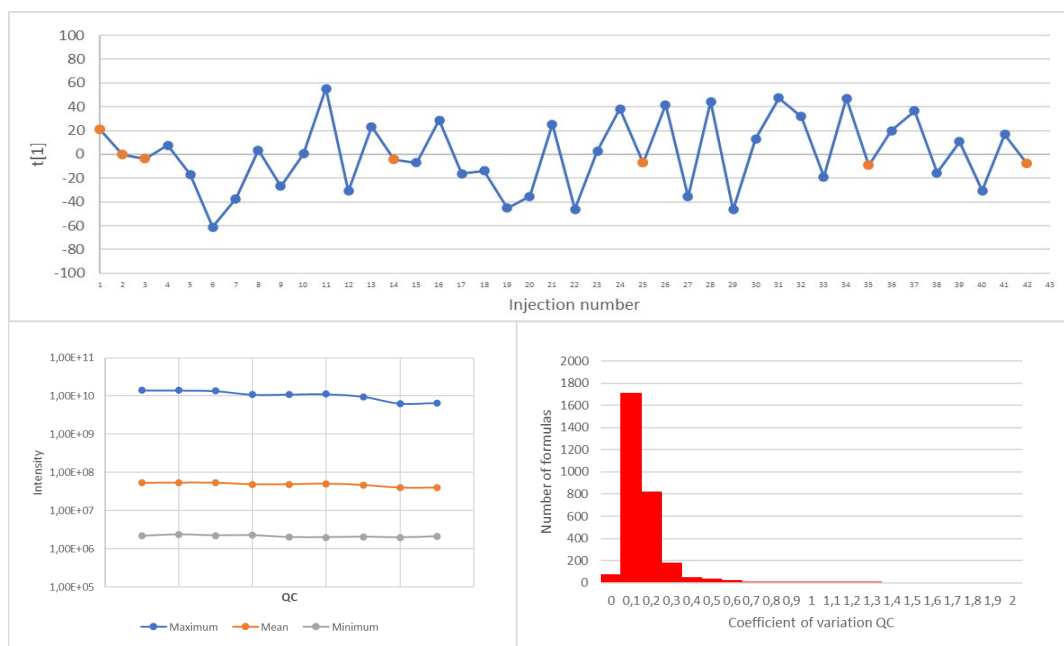
Yashiroda, Y., & Yoshida, M. (2019). Intraspecies cell-cell communication in yeast. *FEMS Yeast Research*, 19(7), foz071. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz071>

Zhang, B.-Q., Luan, Y., Duan, C.-Q., & Yan, G.-L. (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. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00606>

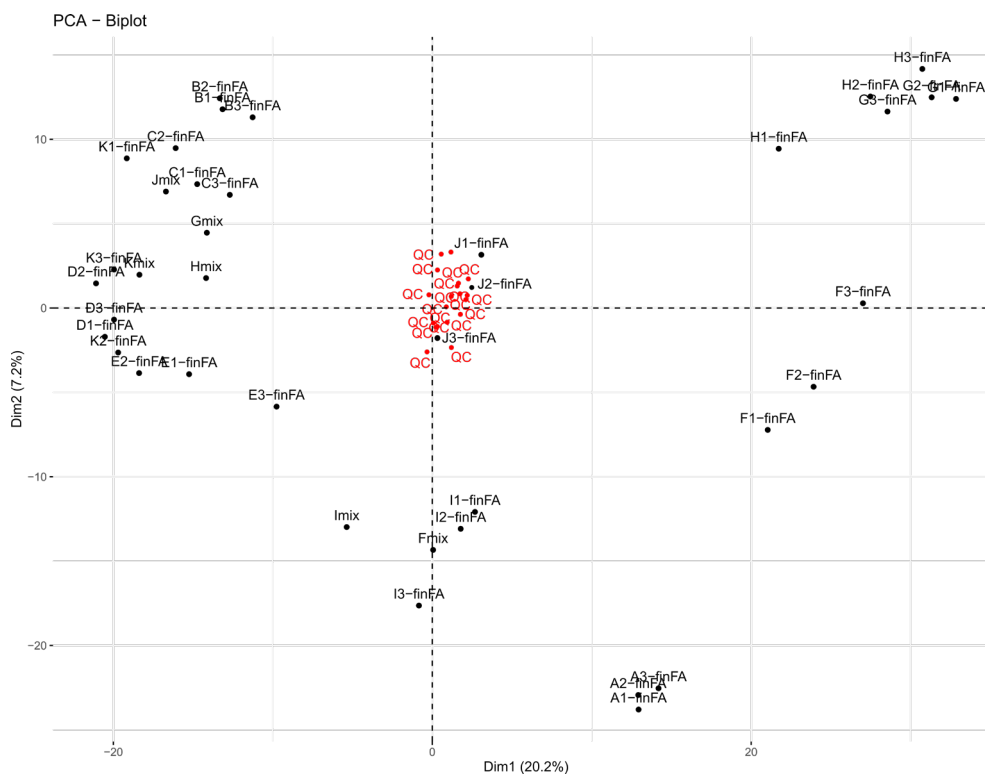
Zilelidou, E. A., & Nisiotou, A. (2021). Understanding Wine through Yeast Interactions. *Microorganisms*, 9(8), 1620. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081620>

Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., & Masneuf-Pomarede, I. (2011). The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 210-215. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026>

VI. Supplementary data



Supplemental Figure S3.1 : (A) Time series plot of the first principal component ($t(1)$) vs. sample run order). QCs are highlighted in orange. (B) Plot representing the maximum, the mean and the minimum of peak intensity for each of QCs. (C) Histogram of all coefficient of variation values computed from the peak intensities from all detected molecular compositions in the FT-ICR-MS data.



Supplemental Figure S3.2 : UPLC-Q-TOF-MS data, PCA score plot of all samples, QCs are highlighted in red.

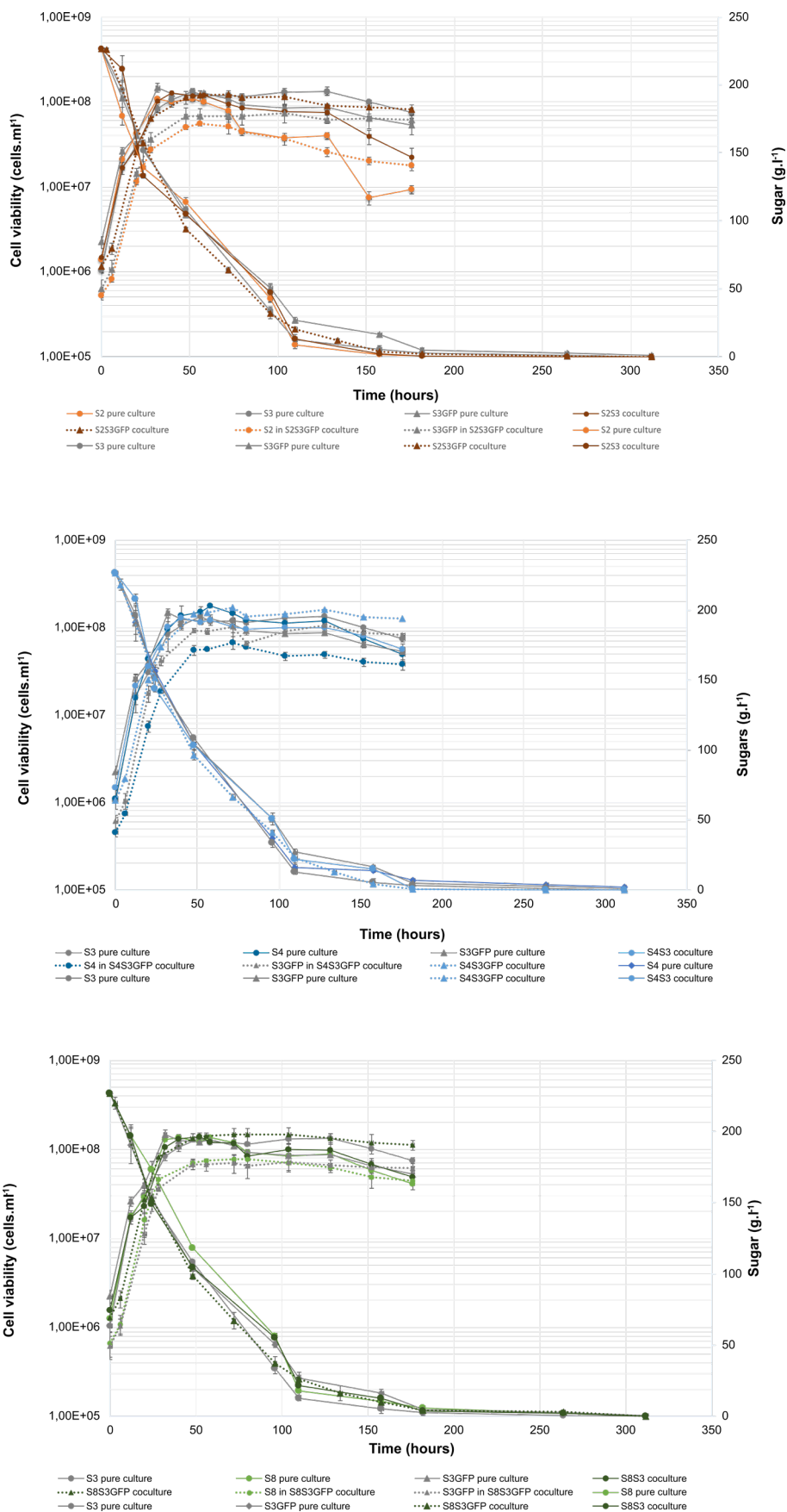
Evaluez l'intensité de chaque descripteur à l'aide de l'échelle, **uniquement au nez** :
 N'hésitez pas à utiliser la totalité de l'échelle

|
 0 : pas du tout intense
 7 : très intense

	0	1	2	3	4	5	6	7
Fruits blancs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vanille	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fruits jaunes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fruits confits	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Agrumes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Oxydation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ananas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Floral	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Amylique	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vernis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Végétal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Réduction	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

← Précédent Suivant →

Supplemental Figure S3.3 : Ballot used for the intensity notation on scale (Redjade software)



Supplemental Figure S3.4 : Fermentation profile comparison in Chardonnay must. Cell viability and sugar consumption were monitored for each condition of *S. cerevisiae* of each modality (S2S3 (orange), S4S3 (blue), S8S3 (green)). Solid curves represent pure culture and dotted curves represent cocultures. For each condition, the experiments were performed in triplicate and the error bars represent the confidence interval

Supplemental Table S3.1 : Table of concentrations of each volatile compound with standard deviation (Nd : no detected)

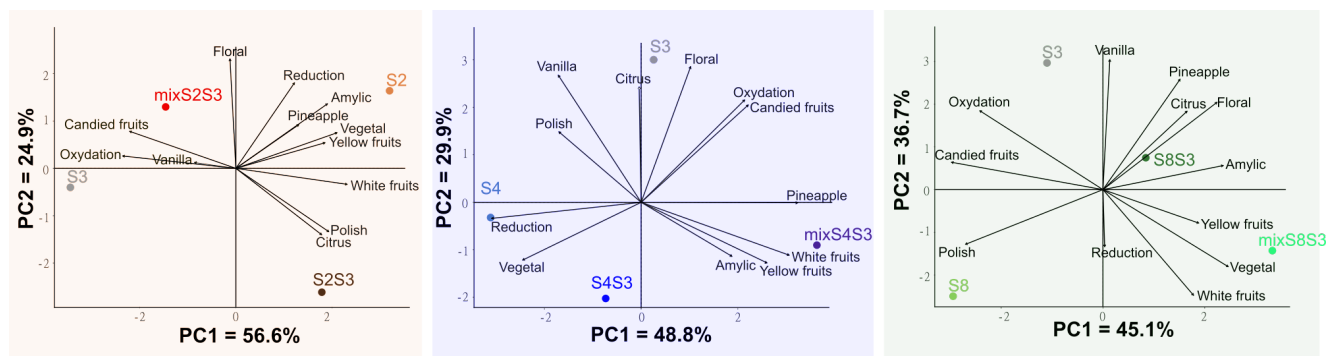
	S3	S2	S4	S8	S2S3	S4S3	S8S3
Acetaldehyde	506.3 ± 42.2	861 ± 92.0	450 ± 38.0	529.7 ± 66.2	632 ± 164.7	491.7 ± 22.9	645 ± 160.0
Diacetyl	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acetoine	134.7 ± 15.1	285 ± 38.7	109 ± 0.0	127.3 ± 7.8	164 ± 30.7	147 ± 5.3	126.7 ± 21.6
Ethyl acetate	38068 ± 2222.0	72445.7 ± 1523.1	38096.3 ± 2577.1	40254.3 ± 3288.4	56718.3 ± 1989.1	40735.7 ± 1222.4	42300.7 ± 1050.2
Isoamyl acetate	1672.7 ± 30.2	5516.7 ± 630.2	1252 ± 115.3	1701.3 ± 150.4	3962 ± 192.0	2006.7 ± 269.6	2084 ± 362
Hexyl acetate	94 ± 11.3	172.3 ± 36.9	69.3 ± 2.4	113 ± 13.3	174.3 ± 7.1	138.7 ± 3.8	140 ± 23.3
Ethyl propanoate	21.3 ± 1.8	30.7 ± 3.8	24.7 ± 2.4	35.7 ± 3.8	37.7 ± 2.9	37 ± 4.0	34.3 ± 1.6
Ethyl butyrate	111.7 ± 5.6	116.3 ± 5.8	90.7 ± 4.4	118 ± 7.3	134 ± 7.3	134.3 ± 16.4	141.7 ± 19.1
Ethyl hexanoate	603.3 ± 89.8	756.7 ± 32.9	587 ± 50.0	640.7 ± 33.6	700.7 ± 28.4	678.7 ± 72.9	703.7 ± 75.6
Ethyl octanoate	627 ± 44.7	729.3 ± 57.6	609.3 ± 26.9	571.7 ± 29.8	686.7 ± 22.4	597 ± 100.0	675.7 ± 49.8
Ethyl decanoate	61.3 ± 4.4	95 ± 0.7	67.7 ± 3.8	88.3 ± 4.2	97.3 ± 3.1	71 ± 26.7	87.3 ± 7.1
Isobutanol	25705.3 ± 1039.8	23801 ± 1355.3	27485.7 ± 2294.2	19806.3 ± 1079.1	21534 ± 1290.7	20899.3 ± 485.1	21141.7 ± 199.6
1-Butanol	473.7 ± 21.1	750 ± 34.0	524.7 ± 53.6	697 ± 60.0	684.7 ± 36.2	645 ± 30.0	622 ± 37.3
Isoamyl alcohol	168006.3 ± 3216.9	202958 ± 2800.7	159696 ± 7109.3	165111.3 ± 3209.1	185724.3 ± 11664.4	160693.7 ± 3549.6	162598 ± 5538
1-Hexanol	579.3 ± 15.6	390 ± 14.0	555.3 ± 29.8	613 ± 19.3	489 ± 13.3	653.7 ± 14.9	610 ± 5.3
c-3-Hexenol	22.3 ± 0.9	29.7 ± 0.9	21.7 ± 0.4	21.7 ± 0.4	22.3 ± 0.4	23.3 ± 0.9	22 ± 0.7
Mentionol	1259.3 ± 101.8	2618.7 ± 125.8	789 ± 97.3	812 ± 32.0	1736.3 ± 243.8	876.3 ± 48.9	1232.7 ± 168.4
Benzyl alcohol	39 ± 2.0	40.3 ± 2.4	37.3 ± 1.1	33.7 ± 0.4	38.3 ± 1.1	38.3 ± 1.1	37.7 ± 1.6
β-Phenylethanol	27324.3 ± 1197.1	53859.3 ± 2229.6	19343 ± 2288	27928.7 ± 1934.9	42970 ± 5334.7	26647.3 ± 125.8	31589.7 ± 4467.8
Ethyl lactate	442.7 ± 13.6	283 ± 16	497.3 ± 32.9	341.3 ± 15.6	300.3 ± 13.1	412.3 ± 9.6	318.7 ± 12.9
Diethyl succinate	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Y-Butyrolactone	1271.7 ± 114.9	795.7 ± 57.8	1246.3 ± 39.8	1160.3 ± 56.9	948 ± 36.0	1478.3 ± 55.6	1033.7 ± 16.2
Acetic acid	310306.7 ± 15018.9	133571.7 ± 20728.4	288357.3 ± 46135.8	412380 ± 44452.0	250908 ± 60639.3	429030.7 ± 7431.1	329575 ± 16870.0
Butyric acid	583 ± 44.0	785.3 ± 30.9	578.3 ± 34.4	616.3 ± 25.8	705 ± 29.3	679.3 ± 50.4	642.3 ± 17.8
Isobutyric acid	1438.3 ± 86.9	1045 ± 62.7	1263.3 ± 47.8	856.7 ± 38.9	1006.7 ± 54.9	1101.7 ± 16.4	1122.3 ± 34.2
Isovaleric acid	844 ± 60.0	1001.7 ± 63.8	867 ± 74.7	672 ± 19.3	878.7 ± 118.9	680 ± 71.3	771.3 ± 157.1
Hexanoic acid	3372.7 ± 157.6	4513.7 ± 20.4	3209 ± 78.0	3991 ± 107.3	4449 ± 95.3	4265.3 ± 214.4	4233.3 ± 161.1
Octanoic acid	4372 ± 105.3	4624 ± 267.3	4339 ± 136.0	6194.7 ± 217.8	5373 ± 189.3	5516 ± 341.3	5157.7 ± 505.1
Decanoic acid	652 ± 42.7	613 ± 128.0	646.7 ± 47.6	930.7 ± 123.6	809.7 ± 77.6	827.3 ± 61.1	719.3 ± 90.9
Ethyl isobutyrate	20.5 ± 1.3	11.2 ± 1.5	14.8 ± 1.3	6.8 ± 4.4	3 ± 3.8	0.2 ± 0.0	4.4 ± 5.7
Ethyl 2-methylbutyrate	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ethyl isovalerate	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Isobutyl acetate	24.4 ± 3.0	58.8 ± 5.1	18.5 ± 0.9	14.7 ± 2	33 ± 1.6	16.8 ± 0.7	20.2 ± 0.7
Butyl acetate	3.9 ± 0.2	10.2 ± 0.9	3.7 ± 0.2	7.9 ± 0.3	6.4 ± 0.1	4.9 ± 1.4	6.4 ± 0.8
Phenylethyl acetate	266.1 ± 4.4	618.8 ± 32.5	200.5 ± 21.6	254.6 ± 7.3	536.3 ± 52.1	234.5 ± 6.2	264.1 ± 18.6
Benzaldehyde	1.2 ± 0.2	4 ± 2.1	1 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.1	1 ± 0.1
Linalool	4.4 ± 0.1	3.9 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.6 ± 0.1	3.7 ± 0.1	4 ± 0.1	3.9 ± 0.1
Linalool acetate	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
α-Terpineol	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.0
β-Citronelol	2 ± 0.0	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.6 ± 0.0	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.1
Geraniol	30.7 ± 0.3	30.3 ± 0.4	30.2 ± 0.2	31.5 ± 1.1	20 ± 13.3	28.4 ± 1.3	29.8 ± 0.9
β-Damascenone	2.1 ± 0.0	2 ± 0.1	1.8 ± 0.0	2.2 ± 0.1	1.8 ± 0.0	1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2
α-Ionone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Ionone	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
Guaiaicol	1.7 ± 0.3	2.7 ± 0.4	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.9 ± 0.3	2.4 ± 0.2	3.7 ± 0.5
o-Cresol	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0
4-Ethylguaiaicol	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	5.2 ± 1	2 ± 1.8	5.8 ± 0.6
m-Cresol	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0
4-Propylguaiaicol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Eugenol	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0
4-Ethylphenol	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	6.3 ± 0.8	3.4 ± 1.3	10.5 ± 1.8
4-Vinylguaiaicol	503.5 ± 15.0	362.2 ± 16.3	253.7 ± 8.0	500.6 ± 21.8	358.2 ± 14	479.3 ± 50.8	384.2 ± 19.2
Isoeugenol	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1 ± 0.3	1.2 ± 0.0	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.5 ± 0.2
2,6-Dimethoxyphenol	2.1 ± 0.4	3.3 ± 0.6	1.6 ± 0.1	2 ± 0.2	1.5 ± 0.0	2 ± 0.5	1.6 ± 0.1
4-Vinylphenol	743.1 ± 54.5	579.2 ± 62.5	550.9 ± 34.0	731.6 ± 51.2	648.7 ± 29.8	748.2 ± 49.9	613.1 ± 43.9
2,6-Dimethoxyphenol	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1 ± 0.1
Ethyl dihydrocinnamate	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	1.5 ± 0.3	0.5 ± 0.2	1.4 ± 0.1
Ethyl cinnamate	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
t-Whiskylactone	0.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.0	1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.0
c-Whiskylactone	6.5 ± 4.1	0.3 ± 0.0	9.4 ± 0.8	6.8 ± 0.3	6.2 ± 0.4	7.7 ± 0.7	7 ± 0.4
Y-Nonalactone	3 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2 ± 0.1	2.4 ± 0.2	2.1 ± 0.1
Y-Decalactone	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.5 ± 0.3	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Vanillin	2.8 ± 1.1	2.2 ± 0.8	2.4 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2	1.9 ± 0.2
Methyl vanilliate	10.3 ± 0.6	9.5 ± 0.7	9.5 ± 0.3	9.9 ± 0.4	6.6 ± 0.6	9.1 ± 1.2	6.4 ± 0.1
Ethyl vanilliate	1 ± 0.5	0.9 ± 0.6	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Acetovanillone	14.8 ± 1.6	15.3 ± 0.9	15.1 ± 0.4	14.4 ± 0.8	8.7 ± 0.7	13 ± 1.7	9 ± 0.4
Siringaldehyde	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Supplemental Table S3.2 : Table of concentrations of each volatile compound associated to an OAV > 1 with standard deviation and letter (S2S3 (orange), S4S3 (blue), S8S3 (green))

	S3	S2	S2S3
Ethyl acetate	38068.0 ± 2.2 ^c	72445.7 ± 1.5 ^b	56718.3 ± 2 ^a
Ethyl butyrate	116.4 ± 5.4 ^b	111.8 ± 5.9 ^{ab}	134 ± 7.2 ^a
Isoamyl acetate	1672.7 ± 30.2 ^c	5516.7 ± 630.2 ^b	3962 ± 192 ^a
Isoamyl alcohol	168006.3 ± 3216.9 ^b	202958 ± 5009.6 ^a	185724.3 ± 2765.8 ^{ab}
Methionol	1259.3 ± 101.8 ^b	2618.7 ± 162.4 ^a	1736.3 ± 182.9 ^b
β-Phenylethanol	27324.3 ± 1197.1 ^b	53859.3 ± 7712.2 ^a	42970 ± 6412.7 ^a
Butyric acid	583 ± 44 ^b	785.3 ± 38.7 ^a	705 ± 56 ^a
Isobutyric acid	1438.3 ± 86.9 ^a	1045 ± 240.2 ^b	1006.7 ± 215.3 ^b
Acetic acid	310306.8 ± 15018.8 ^a	133571.3 ± 20728.5 ^b	250908.3 ± 60639.4 ^{ab}
Hexanoic acid	3372.7 ± 157.6 ^b	4513.7 ± 490.4 ^a	4449 ± 513.1 ^a
Octanoic acid	4372 ± 105.3 ^b	4624 ± 500 ^b	5373 ± 488.9 ^a
Phenylethyl acetate	266.1 ± 4.4 ^b	618.8 ± 109 ^a	536.3 ± 99.8 ^a
β-Damascenone	2.1 ± 0.0 ^a	2 ± 0.2 ^{ab}	1.8 ± 0.2 ^b
β-Ionone	0.3 ± 0 ^a	0.2 ± 0.1 ^a	0 ± 0.1 ^b
4-Vinylguaiacol	503.5 ± 15 ^a	362.2 ± 78.9 ^b	358.2 ± 72 ^b
γ-Decalactone	1.3 ± 0.2 ^a	1.2 ± 0.5 ^a	0.3 ± 0.6 ^b

	S3	S4	S4S3
Isoamyl acetate	1672.7 ± 30.2 ^{ab}	1252 ± 115.3 ^a	2006.7 ± 269.6 ^b
Ethyl butyrate	111.7 ± 5.6 ^{ab}	90.7 ± 4.4 ^b	134.3 ± 16.4 ^a
Methionol	1259.3 ± 101.8 ^a	789 ± 97.3 ^b	876.3 ± 48.9 ^b
β-Phenylethanol	27324.3 ± 1197.1 ^a	19343 ± 2288 ^b	26647.3 ± 125.8 ^a
Acetic acid	310306.7 ± 15018.9 ^b	288357.3 ± 46135.8 ^b	429030.7 ± 7431.1 ^a
Isobutyric acid	1438.3 ± 86.9 ^a	1263.3 ± 47.8 ^{ab}	1101.7 ± 16.4 ^b
Hexanoic acid	3372.7 ± 157.6 ^b	3209 ± 78 ^b	4265.3 ± 214.4 ^a
Octanoic acid	4372 ± 105.3 ^b	4339 ± 136 ^b	5516 ± 341.3 ^a
Phenylethyl acetate	266.1 ± 4.4 ^a	200.5 ± 21.6 ^b	234.5 ± 6.2 ^{ab}
β-Ionone	0.3 ± 0 ^a	0.2 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b
4-Vinylguaiacol	503.5 ± 15 ^a	253.7 ± 8 ^b	479.3 ± 50.8 ^a
4-Vinylphenol	743.1 ± 370.9 ^a	723 ± 34 ^b	748.2 ± 49.9 ^a
γ-Decalactone	1.3 ± 15 ^a	1.3 ± 8 ^a	0.3 ± 50.8 ^b

	S3	S8	S8S3
Methionol	1259.3 ± 101.8 ^a	812 ± 32 ^b	1232.7 ± 168.4 ^a
Acetic acid	310306.7 ± 15018.9 ^b	412380 ± 44452 ^a	329575 ± 16870 ^{ab}
Isobutyric acid	1438.3 ± 86.9 ^a	856.7 ± 38.9 ^c	1122.3 ± 34.2 ^b
Hexanoic acid	3372.7 ± 157.6 ^b	3991 ± 107.3 ^a	4233.3 ± 161.1 ^a
Octanoic acid	4372 ± 105.3 ^b	6194.7 ± 217.8 ^a	5157.7 ± 505.1 ^{ab}
β-Ionone	0.3 ± 0 ^a	0.2 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b
4-Vinylguaiacol	503.5 ± 15 ^a	500.6 ± 21.8 ^a	384.2 ± 19.2 ^b
γ-Decalactone	1.3 ± 0.2 ^a	0.5 ± 0.3 ^b	0.3 ± 0 ^b



Supplemental Figure S3.5 : Biplot of PCA of Chardonnay wines from pure cultures. corresponding co-cultures and post-alcoholic fermentation mixes for each modality (S2S3 (orange), S4S3 (blue), S8S3 (green))

Supplemental Table S3.3 : Annoation of fragmented masses

ID	RT _(min)	m/z	MolecularFormula	Database notation	Condition
497	4,64	187,13383	C10H20O3	10-Hydroxydecanoic acid; 10-Hydroxydecanoate ; 6-Hydroxy-3,7-dimethyloctanoate	S2S3
561	3,84	214,14343	C11H19NO3	N-Heptanoylhomoserine lactone	
762	5,39	215,16491	C12H24O3	12-Hydroxydodecanoic acid; omega-Hydroxydodecanoic acid ; 7-Hydroxydodecanoate	S 2 S 3
763	5,38	239,16148	C12H24O3	12-Hydroxydodecanoic acid; omega-Hydroxydodecanoic acid ; 7-Hydroxydodecanoate	S2S3
764	5,65	239,16125	C12H24O3	12-Hydroxydodecanoic acid; omega-Hydroxydodecanoic acid ; 7-Hydroxydodecanoate	S2S3
1065	2,29	325,0926	C15H18O8	4 -O-beta-D-Glucosyl-cis-p-coumarate ; 4-O-beta-D-Glucosyl-4-hydroxycinnamate ; Bilobalide ; cis-beta-D-Glucosyl-2-hydroxycinnamate; beta-D-Glucosyl-2-coumarinate ; p-Coumaroyl-D-glucose; 1-O-(4-Coumaroyl)-beta-D-glucose; 1-O-(4-Hydroxycinnamoyl)-beta-D-glucose ; trans-beta-D-Glucosyl-2-hydroxycinnamate; beta-D-Glucosyl-2-coumarate	S2S3
1115	4,89	221,18931	C15H24O	(11R)-Dihydroartemisinic aldehyde ; (5R)-Albaflavenol ; (5S)-Albaflavenol ; 10-Hydroxy-alpha-humulene ; 2-trans,6-trans-Farnesal; trans,trans-Farnesal; Farnesal; (2E,6E)-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrienal; (2E,6E)-Farnesal ; 4-n-Nonylphenol; 4-Nonylphenol; p-Nonylphenol ; Alismol ; Artemisinic alcohol ; Butylhydroxytoluene; BHT; 2,6-Di-t-butyl-4-methylphenol; 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol; Butylated hydroxytoluene ; 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol ; Caryophyllene epoxide; Caryophyllene oxide ; Cyperol ; Germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-ol ; Isocyperol ; Nootkatol ; Pentalen-13-ol ; Solavetivol ; [(4S)-4-(5,5-Dimethylcyclohex-1-en-1-yl)-cyclohex-1-en-1-yl]methanol ; alpha-Santalol ; beta-Santalol	S2S3
1487	4,14	336,22756	C18H29N3O3	Myristyltrimethylammonium bromide; Tetradecyltrimethylammonium bromide; MTAB	S2S3
138	2,45	133,08619	C6H12O3	(R)-2-Hydroxyisocaproate; D-2-Hydroxyisocaproate; (R)-2-Hydroxy-4-methylpentanoate; D-Leucate ; 6-Hydroxyhexanoic acid; 6-Hydroxyhexanoate ; Ethyl (R)-3-hydroxybutanoate ; Paraldehyde	S2

249	0,71	136,07583	C8H9NO	(E)-Phenylacetaldoxime; (E)-Phenylacetaldehyde oxime ; (Z)-Phenylacetaldehyde oxime; Z-Phenylacetaldoxime ; 2-Phenylacetamide; alpha-Phenylacetamide ; Acetanilide; N-Phenylacetamide; N-Acetylarylamine ; N-Benzylformamide	S3
1151	1,83	332,21777	C15H29N3O5	LLS ; LTV	S2S3
1248	3,19	328,22293	C16H29N3O4	LPV	S3
1506	2,5	385,24468	C18H32N4O5	GLPV ; APVV	S2S3
1833	3,11	660,37478	C28H57N3O1 2S	DKLWV ; EKVVW ; LLQ ; GATW	S3
14	4,08	101,02348	C4H4O3	Succinic anhydride; Dihydro-2,5-furandione	S3
30	3,74	133,06097	C4H8N2O3	3-Ureidopropionate; 3-Ureidopropanoate; beta-Ureidopropionic acid; N-Carbamoyl-beta-alanine ; Asparagine ; D-Asparagine ; Glycylglycine ; N-Glycylglycine ; L-Asparagine; 2-Aminosuccinamic acid ; Methylazoxymethanol acetate ; N-Carbamoylsarcosine ; N-Nitroso-N-methylurethane ; N ; GG ; GG	S4S3
86	1,47	187,09371	C5H10N6O2	Dinitrosopentamethylenetetramine	S4S3
142	0,87	132,10232	C6H13NO2	(3R)-beta-Leucine; (3R)-3-Amino-4-methylpentanoic acid; (3R)-3-Amino-4-methylvaleric acid ; 6-Aminohexanoate; 6-Aminohexanoic acid; Epsilcapramine; 6-Aminocaproic acid ; D-Isoleucine; (2R,3R)-2-Amino-3-methylvaleric acid ; D-Leucine; D-2-Amino-4-methylvaleric acid ; D-allo-Isoleucine ; Isoleucine ; L-Isoleucine; 2-Amino-3-methylvaleric acid ; L-Leucine; 2-Amino-4-methylvaleric acid; (2S)-alpha-2-Amino-4-methylvaleric acid; (2S)-alpha-Leucine ; L-Norleucine; L-Aminohexanoic acid; L-Aminohexanoate; L-2-Aminohexanoic acid; L-2-Aminohexanoate; (S)-2-Aminohexanoic acid ; L-allo-Isoleucine ; Leucine ; N,N-Diethylglycine ; beta-Alaninebetaine; beta-Alanine betaine; Propiobetaine; Trimethylalanine	S3
192	1,17	180,063	C7H11NO3	2-Hydroxyethylclavam; Hydroxyethylclavam ; 3-Methylcrotonylglycine ; Ethadione ; Paramethadione	S4S3
213	2,72	191,0846	C7H14N2O2S	Aldicarb ; Butocarboxim	S4S3
249	0,71	136,07583	C8H9NO	(E)-Phenylacetaldoxime; (E)-Phenylacetaldehyde oxime ; (Z)-Phenylacetaldehyde oxime; Z-Phenylacetaldoxime ; 2-Phenylacetamide; alpha-Phenylacetamide ; Acetanilide; N-Phenylacetamide; N-Acetylarylamine ; N-Benzylformamide	S3
283	4,08	197,07796	C8H14O4	2-Propylglutaric acid; 2-PGA ; Dimethoxane ; Dimethyl adipate; Dimethyl hexanedioate ; Suberic acid; Cork acid; 1,8-Octanedioic acid; Octanedioic acid; 1,6-Hexanedicarboxylic acid	S3
284	2,97	213,07305	C8H14O5	(R)-3-((R)-3-Hydroxybutanoyloxy)butanoate	S4S3
417	1,4	230,04237	C10H9NO4	1-Nitro-5,6-dihydroxy-dihydronaphthalene; 1,2-Dihydro-5-nitro-1,2-naphthalenediol ; 2-Formaminobenzoylacetate ; 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin ; 4-(2-Aminophenyl)-2,4-dioxobutanoate	S4S3
418	2,68	224,05487	C10H9NO5	3-(1-Carboxyvinyl)oxyanthranilate; 2-Amino-3-[(1-carboxyethenyl)oxy]benzoate; 3-Enolpyruvoylanthranilate ; 4-(2-Amino-3-hydroxyphenyl)-2,4-dioxobutanoate ; 4-(2-Amino-5-hydroxyphenyl)-2,4-dioxobutanoate ; 7,8-Dihydro-7,8-dihydroxykynurenate ; N-Malonylanthranilate	S4S3

425	3,22	177,05419	C10H10O4	2,4,8-Trihydroxy-1-tetralone ; 5-Hydroxyconiferaldehyde ; 6-Hydroxymellein ; Dimethyl phthalate ; Ferulate; Ferulic acid; 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid; 3-Methoxy-4-hydroxy-trans-cinnamate; 4-Hydroxy-3-methoxycinnamate ; Isoferulic acid ; Kakuol; Kakoul ; Methyl caffeate ; Scytalone; 3,4-Dihydro-3,6,8-trihydroxy-1(2H)-naphthalenone	S4S3
478	4,45	155,14273	C10H18O	(+)-Borneol; d-Borneol; Borneocamphor; endo-2-Bornanol; Sumatra camphor; (1R,2S,4R)-(+)-Borneol ; (+)-Isomenthone ; (+)-Linalool; (S)-(+)-Linalool; (3S)-Linalool ; (+)-Menthone ; (+)-Thujan-3-ol ; (+)-trans-Piperitenol ; (+)-trans-Pulegol ; (-)-Borneol; l-Borneol; (1S,2R,4S)-(-)-Borneol; Linderol ; (-)-Isomenthone; l-Isomenthone ; (-)-Linalool; (R)-(-)-Linalool; (3R)-Linalool ; (-)-Menthone; l-Menthone; p-Menthan-3-one ; (-)-alpha-Terpineol; (L)-alpha-Terpineol ; (-)-endo-Fenchol; (-)-alpha-Fenchyl alcohol ; (1R,2R,4R)-Dihydrocarveol; (-)-Dihydrocarveol ; (1R,2R,4S)-Iso-dihydrocarveol ; (1R,2S,4R)-Neo-dihydrocarveol ; (1R,2S,4S)-Neoiso-dihydrocarveol ; (1S,2R,4R)-Neoiso-dihydrocarveol ; (1S,2R,4S)-Neo-dihydrocarveol ; (1S,2S,4R)-Iso-dihydrocarveol ; (1S,2S,4S)-Dihydrocarveol; (+)-Dihydrocarveol ; (R)-(+)-Citronellal ; (R)-(+)-alpha-Terpineol; (+)-alpha-Terpineol ; (S)-(-)-Citronellal; (S)-3,7-Dimethyloct-6-enal ; 1,4-Cineole; 1,4-Epoxy-p-menthane ; 1,8-Cineole; 1,8-Cineol; Eucalyptol; 1,3,3-Trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octane ; 8-p-Menthen-2-ol; 1,6-Dihydrocarveol; 6-Methyl-3-isopropenylcyclohexanol; Menth-8-en-2-ol ; Borneol ; Chrysanthemol ; Citronellal ; Geraniol ; Linalool; 3,7-Dimethylocta-1,6-dien-3-ol; (RS)-Linalool ; Nerol; (Z)-3,7-Dimethylocta-2,6-dien-1-ol ; Sabinene hydrate ; Terpeneol-4; Terpinen-4-ol ; alpha-Terpeneol; dl-alpha-Terpeneol ; beta-Terpeneol ; gamma-Terpeneol	S4S3
496	5,67	173,15307	C10H20O2	Decanoic acid; Decanoate; Decylic acid; n-Capric acid ; Ethyl octanoate; Ethyl caprylate ; Isoamyl isovalerate ; p-Menthan-3,8-diol; (-)-3,8-p-Menthanediol	S4S3
568	2,81	213,15945	C11H20N2O2	1,4 -Bipiperidine-1 -carboxylic acid; [1,4 -Bipiperidine]-1 -carboxylic acid	S3
586	2,54	249,12594	C11H21O4P	MV	S4
594	2,78	231,17013	C11H22N2O3	LV	S4
595	3,07	231,17007	C11H22N2O3	LV	S3
711	3,17	227,1751	C12H22N2O2	1,8-Diazacyclotetradecane-2,9-dione; Cyclo(L-leucyl-L-leucyl); (3S,6S)-3,6-Diisobutylpiperazine-2,5-dione	S4S3
759	2,59	261,18079	C12H24N2O4	Carisoprodol	S3
760	3,07	261,18076	C12H24N2O4	Carisoprodol	S4
764	5,65	239,16125	C12H24O3	12-Hydroxydodecanoic acid; omega-Hydroxydodecanoic acid ; 7-Hydroxydodecanoate	S4S3
794	2,71	214,08587	C13H11NO2	Benzyl nicotinate; Nicotinic acid benzyl ester ; Fenamic acid; Diphenylamine-2-carboxylic acid; DPC ; Salicylanilide	S4S3
846	2,68	207,13766	C13H20O3	(+)-7-Isomethyljasmonate ; (+; -)-6-Hydroxy-3-oxo-alpha-ionol; Vomifoliol ; (6S,9R)-Vomifoliol; (6S,9R)-6-Hydroxy-3-oxo-alpha-ionol ; Methyl jasmonate; (-)-Methyl jasmonate	S4S3

905	3,3	229,08562	C14H12O3	2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone; Oxybenzone ; 3,4-Dihydro-8,9-dihydroxy-1(2H)-anthracenone ; 4,4 ,6-Trimethylangelicin ; 4-Isonicotinoylnicotinamide; 4-INN ; 5,6-Dehydrokawain ; Benzylparaben; Benzyl parahydroxybenzoate; Benzyl 4-hydroxybenzoate ; Resveratrol; 3,4 ,5-Trihydroxystilbene; trans-Resveratrol ; Seselin ; Trioxsalen; Trioxysalen; 4,8,5 -Trimethylpsoralen ; Xanthyletin	S4S3
919	2,06	263,13964	C14H18N2O3	Methohexital ; Physovenine	S4
928	2,13	265,15453	C14H20N2O3	Feruloylputrescine; Subaphyllin ; PF	S4
970	1,54	336,15838	C14H26NO6P	MSV ; CLT	S3
971	4,45	287,19636	C14H26N2O4	N-Acetyl-leucyl-leucine ; FV	S4S3
1046	1,91	291,08645	C15H14O6	(+)-Catechin; D-Catechin; Cyanidanol; (2R-trans)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-3,5,7-triol; (2R,3S)-Catechin; (2R,3S)-(+)-Catechin; Cianidanol ; (+)-Epicatechin; ent-Epicatechin ; (-)-Catechin ; (-)-Epicatechin ; 2,8-Dihydroxy-3,4,7-trimethoxydibenzofuran ; Catechin; (+; -)-Catechin ; Fisetinidol-4beta-ol; (-)-Mollisacacidin; Fisetinin-3,4-diol; 5-Deoxyleucocyanidin ; Isoplumericin ; Luteoforol; 3-Deoxyleucocyanidin ; Mikanolide ; Plumericin ; Ptaeroglycol ; alpha-Cotonefuran ; cis-3,4-Leucopelargonidin	S4S3
1095	2,39	295,16515	C15H22N2O4	LY	S3
1151	1,83	332,21777	C15H29N3O5	LLS ; LTV	S3
1349	1,79	474,25524	C17H27N15O2	EKPT ; DLLN ; GG ; DLQ ; GAV ; ELN ; GGV ; EQ ; GAVV ; DGGLL ; ADGLV ; AADV ; EGGLV ; AEGVV ; AAAEL ; ALPSS ; GLPST ; APSTV ; GPTTV	S3
1365	1,1	371,22892	C17H30N4O5	GPVV ; AALP	S4
1366	1,62	371,22859	C17H30N4O5	GPVV ; AALP	S4S3
1528	3,67	358,26956	C18H35N3O4	Leucyl-leucyl-norleucine LLL	S4
1548	5,72	300,28903	C18H37NO2	3-Dehydrosphinganine; 3-Dehydro-D-sphinganine ; Palmitoylethanolamide; Palmidrol ; Sphingosine; Sphingenine; Sphingoid; Sphing-4-enine	S4S3
1558	5,32	318,29953	C18H39NO3	Phytosphingosine; 4-D-Hydroxysphinganine	S4S3
1616	3,66	388,24343	C19H37N3OS2	GRR	S4
1690	2,99	465,10239	C21H20O12	6-Hydroxyluteolin 7-glucoside ; Bracteatin 6-O-glucoside; Bracteatin 6-O-beta-D-glucoside ; Gossypetin 8-rhamnoside ; Hyperin; Quercetin 3-galactoside ; Myricitrin; Myricetin 3-O-rhamnoside ; Quercetin 3-O-glucoside; Isoquercitrin; 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3-(beta-D-glucofuranosyloxy)-5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one; Isotrifoliin ; Quercimeritrin; Quercetin 7-O-beta-D-glucoside ; CCCH	S4S3
1746	3,14	472,25499	C23H37NO9	GLPW ; APVW	S4S3
1804	1,49	615,26201	C26H49O10P3	CFKMS ; CCKVY ; ACKMY ; FFGMN ; GG ; ACFFQ ; GA	S4S3
1833	3,11	660,37478	C28H57N3O12S	DKLVW ; EKVWV ; LLQ ; GATW	S3
14	4,08	101,02348	C4H4O3	Succinic anhydride; Dihydro-2,5-furandione	S3
213	2,72	191,0846	C7H14N2O2S	Aldicarb ; Butocarboxim	S8

256	3,43	122,09692	C8H11N	1-Phenylethylamine; alpha-Phenylethylamine; alpha-Methylbenzylamine ; 2,4-Xylidine; 2,4-Dimethylaniline; 2,4-DMA ; 2,5-Xylidine; 2,5-Dimethyl-benzenamine ; 2,6-Dimethylaniline; 2,6-DMA; 2,6-Xylidine ; N,N-Dimethylaniline; Dimethylaminobenzene; N,N-Dimethylbenzenamine ; N-Ethylaniline; N-Ethylbenzenamine ; Phenethylamine; 2-Phenylethylamine; beta-Phenylethylamine; Phenylethylamine	S3
283	4,08	197,07796	C8H14O4	2-Propylglutaric acid; 2-PGA ; Dimethoxane ; Dimethyl adipate; Dimethyl hexanedioate ; Suberic acid; Cork acid; 1,8-Octanedioic acid; Octanedioic acid; 1,6-Hexanedicarboxylic acid	S3
321	2,43	163,03871	C9H6O3	4-Hydroxycoumarin ; Umbelliferone; 7-Hydroxycoumarin	S8S3
349	4,4	182,08059	C9H11NO3	(S)-beta-Tyrosine ; 3-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoate; beta-Tyrosine ; 3-Hydroxy-L-phenylalanine; 3-Tyrosine ; D-Tyrosine; (R)-3-(p-Hydroxyphenyl)alanine; (R)-2-Amino-3-(p-hydroxyphenyl)propionic acid ; L-Tyrosine; (S)-3-(p-Hydroxyphenyl)alanine; (S)-2-Amino-3-(p-hydroxyphenyl)propionic acid; Tyrosine ; L-threo-3-Phenylserine ; N-Hydroxy-L-phenylalanine; 2-(Hydroxyamino)-3-phenylpropanoate ; Tyrosine; 3-(p-Hydroxyphenyl)alanine; 2-Amino-3-(p-hydroxyphenyl)propionic acid ; gamma-Hydroxy-3-pyridinebutanoate	S8S3
390	1,29	203,13883	C9H18N2O3	AL	S8S3
545	5,1	210,11171	C11H15NO3	Anhalamine; N-Demethylanhalidine ; Propoxur; Aprocarb; 2-Isopropoxyphenyl N-methylcarbamate ; Tyr-OEt ; p-Lactophenetide; 4 -Ethoxylactanilide; Lactylphenetidid	S8S3
762	5,39	215,16491	C12H24O3	12-Hydroxydodecanoic acid; omega-Hydroxydodecanoic acid ; 7-Hydroxydodecanoate	S8
1506	2,5	385,24468	C18H32N4O5	GLPV ; APVV	S8
1587	5,1	336,21628	C19H29NO4	Ankorine	S8S3
1651	2,36	424,2074	C20H29N3O7	Amicoumacin A ; ELY	S8
1679	2,12	457,26483	C20H40O11	DLLP ; ELPV	S8S3
2021	2,52	298,52004	C49H80O12S	Chlorophyll a	S8S3

Conclusions Chapitre 3

Les expérimentations menées ont permis de mettre en évidence au travers des études préliminaires et de l'article, des phénomènes d'interactions entre deux souches de *S. cerevisiae*. En effet, la composition chimique et aromatique des vins issus de cultures pures s'est révélée singulière de celle des vins issus de co-cultures. En outre, ces derniers se sont avérés différents des assemblages des vins issus de cultures pures indiquant l'existence d'interactions entre les deux populations associées. Malgré l'absence d'avantage de fitness de l'une des souches de *S. cerevisiae* au sein de la co-culture, ces interactions ont conduit à des modifications de la composition chimique et du profil sensoriel du vin. Concernant les composés volatils, les familles des esters, des acides gras et des phénols ont été affectées par l'association de deux souches de *S. cerevisiae*. En outre, des centaines de composés ont permis de mettre en évidence des distinctions métabolomiques entre co-culture et cultures pures au sein de chaque modalité. Ces composés dont la présence ou l'intensité était liée aux interactions étaient majoritairement impliqués dans le métabolisme central de l'azote, dont principalement les voies du métabolisme des acides aminés. Les approches classiques telles que le suivi de population dans le temps se sont avérées insuffisantes pour déterminer et décrire le type d'interactions qui se produisent. Une approche globale combinant différentes techniques permet donc d'avancer dans la compréhension de ces interactions. Il a également été reporté que selon les souches impliquées dans cette co-culture les phénomènes d'interactions différaient, aussi ces phénomènes seraient donc souche dépendant.

Cette modulation du profil aromatique et chimique des vins par des interactions entre deux souches de *S. cerevisiae* sans altérer les propriétés fermentaires offre la possibilité d'utiliser des levures *S. cerevisiae* sous forme de levains mixtes pour moduler le profil des vins. Toutefois, il est nécessaire de prendre en compte ces phénomènes lors de l'association de deux souches dont les impacts ne peuvent être définis uniquement selon les dynamiques de populations.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La co-inoculation apparaît désormais comme un outil pour moduler les profils aromatiques des vins. La plupart des études visant cet objectif se sont focalisées sur des couples non-*Saccharomyces* / *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, des difficultés d'implantation sont observées de façon récurrente pour les espèces de non-*Saccharomyces*. En outre, les processus de production restent parfois complexes pour ces espèces. Une alternative pour moduler les profils aromatiques des vins consiste au recours de co-inoculations de deux souches de *S. cerevisiae* connues pour leurs performances fermentaires et leur facilité d'implantation. Peu d'études se sont intéressées à décrire ces couples et les phénomènes d'interactions associés. Aussi, cette thèse a permis d'étudier l'impact de ces co-inoculations, de décrire les interactions et leurs impacts sur une matrice Chardonnay.

En premier lieu, l'étude phénotypique de douze souches de *S. cerevisiae* œnologiques commerciales en moût de Chardonnay a permis de mettre en exergue des cinétiques de croissance et fermentaires très similaires quelle que soit la souche. Dans un deuxième temps, et malgré des performances technologiques similaires, des variations métaboliques ont pu être dégagées. En effet, l'empreinte métabolomique propre à chacune des souches en moût de Chardonnay a pu être établie grâce à l'utilisation de spectrométrie de masse à ultra haute résolution (FT-ICR-MS), soulignant l'extraordinaire diversité intraspécifique de *S. cerevisiae*, malgré des fonds génétiques voisins. De plus, il a été montré que les voies métaboliques participant à cette diversité appartenait principalement au métabolisme azoté avec des biomarqueurs appartenant aux voies de biosynthèse des acides aminés, ou encore aux métabolismes des acides aminés comme la valine, leucine, isoleucine par exemple. Le métabolisme de l'azote semble contribuer également à l'importante diversité intraspécifique observée à l'échelle du volatilome. En effet des familles de composés volatiles comme les esters ou les acides gras ont vu leurs concentrations fortement impactées en fonction des souches utilisées. Enfin, l'analyse sensorielle réalisée par un jury entraîné a permis de répartir en trois classes, les différents vins issus des douze souches, selon des descripteurs aromatiques caractéristiques des vins blancs. Ce premier axe de thèse a ainsi permis de mettre en évidence une importante diversité intraspécifique entre douze souches de *S. cerevisiae* à l'aide d'une approche combinant la microbiologie, l'analyse sensorielle, l'analyse du volatilome et du métabolome non volatile, par des approches ciblées et non ciblées.

Parmi les douze souches de *S. cerevisiae* caractérisées, quatre souches ont été sélectionnées pour leur diversité métabolomique et leur impact sensoriel sur le vin, afin d'étudier l'impact de la co-inoculation de deux souches de *S. cerevisiae* sur la composition chimique et le profil

aromatique des vins. Cette étude visait à caractériser les souches en conditions de co-cultures. Afin de déterminer un éventuel impact, de l'association des deux souches, sur la population de l'une d'entre elle, pouvant contribuer aux modifications chimiques et aromatiques des vins, il était nécessaire de commencer par suivre la dynamique de population des souches de *S. cerevisiae* au sein de la co-culture. En vue de s'affranchir des contraintes de cultivabilité, mais également pour utiliser une technique rapide, la cytométrie en flux est un outil de choix pour le suivi en temps réel de populations microbiennes. Cependant, la discrimination de deux souches d'une même espèce de levure nécessitait l'intégration d'un gène codant pour une protéine fluorescente, à savoir une eGFP, au sein du génome d'une des souches impliquées dans la co-culture. Cette modification génétique a donné lieu au second axe de la thèse visant à vérifier l'absence d'impact de cette intégration génétique sur le phénotype levurien (croissance, performances fermentaires). Il a été montré, par LC-Q-ToF-MS, que malgré l'absence de modification à l'échelle des critères phénotypiques utiles à notre étude, cette dernière induisait une modification certaine sur le métabolisme principal de la levure. En effet, 285 composés ont vu leur abondance affectée par l'insertion du gène *eGFP* dans le gène *HO*. Il a ainsi été souligné, une importante modification de l'expression du peptidome chez la souche modifiée. Différentes hypothèses ont été soulevées pour comprendre l'origine de cette variation qui reste à ce jour encore à déterminer. Une dimension supplémentaire à cette étude pourrait donc être apportée en réalisant des expérimentations complémentaires (transposition vers d'autres matrices, un autre gène cible ...) permettant de valider ou rejeter certaines hypothèses et ainsi trouver l'origine de la variation.

L'impact de cette insertion du gène *eGFP* dans le gène *HO* a été évaluée en conditions fermentaires en moût de Chardonnay. Aussi, il est envisagé que les effets observés sur le métabolisme de la souche modifiée soient en partie liés à la matrice utilisée. Ainsi, la transposition de la réalisation de cette expérimentation à une autre matrice pourrait contribuer à la vérification de l'unique impact de l'intégration génique, d'un point de vue métabolomique. En effet, il serait alors possible de définir des biomarqueurs associés à cette modification génétique quelle que soit la matrice d'étude, afin d'interpréter au mieux son impact sur le métabolisme levurien en s'affranchissant des conditions environnementales.

D'autre part, l'intégration du gène codant pour la eGFP au sein du gène cible *HO* pourrait être à l'origine de cette modification métabolomique. Aussi, un autre gène cible connu comme neutre vis-à-vis des performances fermentaires pourrait être sélectionné pour l'intégration du gène *eGFP*. En l'absence de modification du métabolome lors de l'insertion du gène *eGFP*

dans un autre gène cible, il serait possible de conclure que la modification d'expression du peptidome était uniquement imputable à la perturbation du gène *HO*.

Enfin, la protéine eGFP est connue pour provoquer un stress oxydatif, toxique pour la cellule, pouvant impacter le métabolisme et la survie de la levure. Par conséquent, l'intégration d'un gène codant pour une protéine fluorescente d'une autre nature pourrait permettre d'écarter l'hypothèse d'une éventuelle toxicité cellulaire induite par la eGFP.

Cette étude permet donc de mettre en lumière, à l'échelle métabolomique, l'impact d'une telle modification génétique. Aussi, cette dernière participe à une meilleure caractérisation de cette approche génétique aujourd'hui couramment utilisée. Toutefois, il est important de noter que le recours à cette protéine peut avoir une incidence sur le métabolisme levurien malgré l'absence de différence phénotypique. Aussi, il serait à considérer, l'importance de réaliser des études phénotypiques plus approfondies afin de s'assurer de la pertinence des conclusions ou hypothèses émises dans le cadre de travaux qui en font l'usage.

Cette transformation génétique a donné lieu à l'utilisation de la souche S3GFP pour le suivi de la dynamique de population au cours de la fermentation alcoolique dans le cadre des co-cultures. Du fait de l'importance des modifications métaboliques observées lors de l'intégration du gène *eGFP*, seules les données relatives aux conditions intégrant la souche originale S3 issues des analyses chimiques et sensorielles ont été traitées.

A l'échelle microbiologique, la co-inoculation de deux souches de *S. cerevisiae* en moût de Chardonnay n'a eu que peu d'impact sur la cinétique fermentaire des vins et les paramètres de croissance levurienne. Aucun avantage de fitness entre les deux souches en présence n'a été observé, seulement une population plus importante pour l'une des souches a été relevée pour une des trois modalités. A cette première échelle d'étude, des interactions neutres ont été notées pour deux couples tandis que le troisième présentait des éléments pouvant s'apparenter à des interactions négatives. Dans ce dernier cas, l'évolution des deux populations en présence pourraient être liées à des phénomènes de compétition pour les ressources nutritives notamment les ressources azotées qui jouent un rôle clé dans l'établissement de la biomasse. Des études antérieures, utilisant des techniques de chromatographie en phase liquide, ont pu mettre en évidence une modulation de la consommation des acides aminés dans le cadre d'une co-culture (Gobert et al., 2017; Petitgonnet et al., 2019). De manière à évaluer ce type d'interaction, il serait intéressant d'une part de savoir comment l'assimilation des composés azotés est affectée par les interactions en caractérisant la composition du milieu initial et en suivant la

consommation des composés azotés au cours de la fermentation alcoolique dans les cultures pures et dans la co-culture. Pour aller plus loin, dans le cas d'un effet certain des interactions sur le profil de consommation des ressources, il serait pertinent d'identifier quelles sont les ressources spécifiques qui induisent ces modifications et quels sont les mécanismes impliqués dans la régulation de cette consommation lors de cette perturbation environnementale. Ainsi, il pourrait être envisagé d'étudier les impacts au niveau du métabolome mais également à d'autres niveaux d'études tel que le transcriptome dans le cadre d'une modulation de ces ressources une à une. Enfin, pour parfaire cette approche et confirmer ces phénomènes, une étude du devenir de ces ressources par fluxomique serait à considérer (Camarasa *et al.*, 2003; Celton *et al.*, 2012; Nidelet *et al.*, 2016). Cette approche novatrice permettrait à la fois de déterminer les sources préférentielles nutritives ainsi que le fonctionnement des voies métaboliques dans lesquelles les atomes marqués seraient retrouvés en cas de réponse à un stress comme la présence d'une autre souche de *S. cerevisiae*.

Selon la perspective de la composition du vin, cette co-inoculation a conduit à une modulation de la composition du volatilome en comparaison avec les cultures pures pour les trois modalités. L'absence de différence de population entre les deux souches au sein de la co-culture, pour deux des trois modalités, a permis de conclure que cette modulation de composition de la fraction volatile était uniquement due aux interactions occasionnées par la mise en présence des deux souches de *S. cerevisiae*. Parmi les composés volatiles présentant une modulation de la concentration entre les cultures pures et les co-cultures, étaient retrouvés majoritairement des composés volatiles fermentaires synthétisés par *S. cerevisiae* mais également des composés, issus de précurseurs variétaux dont la β -ionone et la γ -decalactone, libérés par intervention de cette même levure. Les voies métaboliques impliquées dans la synthèse de composés volatiles fermentaires sont aujourd'hui connues. En outre, le lien entre la nature des ressources azotées disponibles dans le milieu et la synthèse de composés volatiles a été abordé dans le cadre de cultures pures (Duc *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2021). Une importante diversité intraspécifique d'un point de vue des préférences pour les ressources nutritionnelles induisant une hétérogénéité de la production de composés volatiles a été confirmée dans des travaux récents (Scott *et al.*, 2021). Toutefois, en 2017 Crépin et collaborateurs ont pu observer que la gestion des ressources exogènes d'acides aminés ne conduisait pas nécessairement à une modification de la synthèse de ces composés volatiles, le squelette carboné de ces derniers provenant d'autres sources tels que le glucose (Crépin *et al.*, 2017). Par conséquent, les phénomènes d'interactions tels que la compétition pour les

ressources nutritionnelles pourraient être à l'origine d'une modulation de l'assimilation de ces ressources et ainsi induire une modification de la synthèse des composés volatiles. En outre, les mécanismes de régulation de ces dernières dans le cadre d'interactions restent à approfondir.

Enfin, la variation de concentration de composés volatiles issus de précurseurs variétaux dans la co-culture suggère une modulation de l'activité enzymatique à l'origine de la libération du composé odorant. Une étude de l'activité de certaines enzymes engagées dans ces réactions semble donc une piste à approfondir.

Selon la perspective sensorielle, l'évolution du profil aromatique des vins a également été associée à cette évolution de la fraction volatile. Le vin issu de la co-culture a arboré un profil aromatique très différent de ceux issus des cultures pures et des assemblages. Cette approche se révèle essentielle pour la caractérisation des vins issus des co-cultures. En effet, malgré l'absence d'impact sur la cinétique fermentaire, l'association de deux souches de *S. cerevisiae* module significativement le profil aromatique des vins. De plus, nous avons pu confirmer au travers des différentes études menées, que la corrélation entre le volatilome et l'analyse sensorielle était particulièrement complexe. Des interactions intervenant entre les composés ou bien encore avec la matrice qui s'ajoutent à une perception différentielle des arômes en fonction de la physiologie humaine et de l'éducation sensorielle, rendent une interprétation de la composition du volatilome insuffisante pour décrire le profil aromatique des vins.

Aussi, l'approche métabolomique a conduit à mettre en évidence des changements métaboliques, et confirmer que les co-cultures ne se révélaient pas être de simples additions des deux cultures pures. En effet, la comparaison avec un assemblage 50/50 (v/v) de vins issus de deux cultures pures associées à une co-culture a permis de confirmer la présence d'interactions entre les deux souches impliquées. Ceci a été renforcé par l'importante modification d'empreinte métabolomique entre les cultures pures et les co-cultures. Cependant, le recours à une souche commune pour l'ensemble des trois couples de l'étude a permis de mettre en évidence que selon la souche en association avec cette dernière, les interactions et l'impact sur la matrice différaient. Les voies métaboliques impliquées dans les phénomènes d'interactions rencontrés au cours de notre étude se sont avérées appartenir majoritairement au métabolisme azoté. Ce constat renforce l'importance de ce métabolisme dans les phénomènes d'interactions entre deux souches de *S. cerevisiae* et ainsi réaffirme l'intérêt de cibler ce métabolisme pour approfondir les mécanismes impliqués dans les interactions comme cité précédemment. Une modulation de la concentration ou de l'abondance de précurseurs, intermédiaires et produits des

voies métaboliques a été mis en exergue par caractérisation du volatilome et du métabolome non volatile, contribuant à la compréhension des mécanismes d'interactions. Un grand nombre de biomarqueurs a en effet été extrait, annoté à l'aide de comparaison à des bases de données, fragmenté et seulement un petit pourcentage identifié formellement. Le développement des bases de données, actuellement facteur limitant dans l'analyse métabolomique, notamment par l'augmentation de données de fragmentation de composés standards, permettrait un enrichissement des identifications structurales et donc une possibilité accrue pour la caractérisation des interactions. De plus, la combinaison d'une analyse ciblée des composés identifiés impliqués dans ces mêmes voies permettrait d'affiner l'observation de leur évolution dans des conditions données et approfondir la compréhension de l'impact et mécanismes de ces interactions.

La compétition pour les nutriments est un axe de recherche très prometteur au vu des différentes observations réalisées au cours de la thèse. Néanmoins, une autre piste d'investigation reste le phénomène de cell-cell contact décrit par (Renault et *al.*, 2013) ou encore plus récemment (Petitgonnet et *al.*, 2019). Ces dernières études ont permis de décrire ces phénomènes via l'utilisation d'un bioréacteur à double compartiment séparé par une membrane permettant la séparation physique des deux populations en présence. Ces phénomènes ont également fait l'objet d'investigations en soumettant les levures à l'étude à des mutations génétiques visant à initier une modification de la structure membranaire impliquée dans les contacts cellule-cellule (Rossouw et *al.*, 2018).

Un aspect important de ce travail demeure dans l'utilisation d'une combinaison d'approches complémentaires. Une caractérisation microbiologique a permis le suivi de la dynamique de population, des différentes souches en cultures pures et au sein de la co-culture, à laquelle a été associée des techniques d'analyse chimique ciblées et non ciblées (GC-MS, LC-MS et uHRMS), les biostatistiques, ainsi qu'une évaluation sensorielle des vins en fin de fermentation alcoolique, indispensable dans le cadre de l'étude de produits de consommation comme le vin dont l'objectif est de développer des profils aromatiques différents.

La métabolomique s'est révélée au travers de cette thèse un outil de choix performant quant à la mise en évidence de différences de composition des vins selon la souche de *S. cerevisiae*, une modification génétique ou encore les phénomènes d'interactions entre deux souches de *S. cerevisiae* mis en jeu. Cette approche encore novatrice a permis de dégager des biomarqueurs du métabolisme levurien en culture pure ou en association avec une autre levure. Il serait

intéressant de pouvoir établir une bases de données rapportant des biomarqueurs spécifiques des phénomènes d'interactions en menant un screening de plus grande envergure et en faisant varier les matrices et les souches mises en jeu. Ces biomarqueurs pourraient alors devenir des métabolites à cibler pour des études futures. Il est important de rappeler que dans cette étude, une fraction de la diversité chimique de nos vins a été abordée. Différentes techniques de séparation, et d'analyse pourraient contribuer à étoffer le panel chimique considérable déjà à l'étude grâce aux deux techniques de spectrométrie de masse (UPLC-Q-ToF-MS et FT-ICR-MS). En effet, dans le cadre de ce travail nous nous sommes intéressés à l'exométabolome levurien. Cette approche visant à étudier le métabolome correspondant à la fraction de métabolites exsudés, relargués et excrétés par la levure peut s'avérer présenter des limites quant à l'interprétation des phénomènes biologiques. En effet, l'intérêt de l'endométabolome réside dans le fait qu'il ne reflète a priori que les métabolites issus du métabolisme levurien. D'autre part, une étude que nous avons réalisé en parallèle de mes travaux de thèse a permis de mettre en évidence la dominance d'une souche de *S. cerevisiae* sur une souche de *T. delbrueckii* en co-culture ainsi que l'évolution de la composition moléculaire au cours du temps (Roullier-Gall et al., 2021). En effet, un suivi visant à établir l'évolution du métabolisme levurien au cours du temps permettrait d'évaluer et discriminer l'apport de chacune des deux souches sur la composition finale du vin. Pour un objectif plus appliqué, en combinaison avec une approche sensorielle, cette évaluation de l'apport de chacune des souches pourrait également participer à l'étude et au développement de starters, présentant des proportions optimales de chacune des souches afin de tendre à une modulation chimique et aromatique plus fine.

La maîtrise de la qualité des vins est un enjeu majeur du vinificateur. Ce dernier a ainsi souvent recours à l'ensemencement de levures sèches actives pour conduire la fermentation alcoolique et moduler le profil aromatique du vin. Ces dernières années ont connu l'essor de levains mixtes, cependant les mécanismes d'interactions mis en jeu lors de la fermentation alcoolique ne sont pas encore élucidés. Toutefois, le recours à un levain mixte ne conduit pas toujours à une addition des propriétés aromatiques des souches en présence et peut conduire à un amoindrissement de la qualité aromatique des vins. L'étude de ces interactions et leur impact sur la matrice reste donc aujourd'hui essentielle pour optimiser le développement de nouvelles combinaisons de levures visant à diversifier les profils aromatiques et proposer des solutions personnalisées aux producteurs de la filière vitivinicole.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguilera, F., Peinado, R., Millan, C., Ortega, J., & Mauricio, J. (2006). Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, *110*(1), 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.02.002>
- Alañón, M. E., Pérez-Coello, M. S., & Marina, M. L. (2015). Wine science in the metabolomics era. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *74*, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.006>
- Albergaria, H., & Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: Role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(5), 2035-2046. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7255-0>
- Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., & Gírio, F. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(3), 965-972. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2409-6>
- Albergaria, H., Torrao, A. R., Hogg, T., & Gírio, F. M. (2003). Physiological behaviour of *Hanseniaspora guilliermondii* in aerobic glucose-limited continuous cultures. *FEMS Yeast Research*, *3*(2), 211-216. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00187-3](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00187-3)
- Alexandre, H., Berlot, J. P., & Charpentier, C. (1994). Effect of ethanol on membrane fluidity of protoplasts from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* grown with or without ethanol, measured by fluorescence anisotropy. *Biotechnology Techniques*, *8*(5), 295-300. <https://doi.org/10.1007/BF02428970>
- Alexandre, H., & Charpentier, C. (1998). Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *20*(1), 20-27. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900442>
- Alonso-del-Real, J., Lairón-Peris, M., Barrio, E., & Querol, A. (2017). Effect of Temperature on the Prevalence of *Saccharomyces* Non *cerevisiae* Species against a *S. cerevisiae* Wine Strain in Wine Fermentation: Competition, Physiological Fitness, and Influence in Final Wine Composition. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00150>
- Álvarez-Pérez, J. M., Campo, E., San-Juan, F., Coque, J. J. R., Ferreira, V., & Hernández-Orte, P. (2012). Sensory and chemical characterization of the aroma of Prieto Picudo rosé wines : The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry*, *133*(2), 284-292. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.024>
- Alves, Z., Melo, A., Figueiredo, A. R., Coimbra, M. A., Gomes, A. C., & Rocha, S. M. (2015). Exploring the *Saccharomyces cerevisiae* Volatile Metabolome: Indigenous versus Commercial Strains. *Plos one*, *10*(11), e0143641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143641>
- Andorrà, I., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2010). Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(2), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.003>
- Aouida, M., Khodami-Pour, A., & Ramotar, D. (2009). Novel role for the *Saccharomyces cerevisiae* oligopeptide transporter Opt2 in drug detoxification In memory of Ghassan Belhadj.

Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire, 87, 653-661. <https://doi.org/10.1139/o09-045>

Arapitsas, P., Ugliano, M., Perenzoni, D., Angeli, A., Pangrazzi, P., & Mattivi, F. (2016). Wine metabolomics reveals new sulfonated products in bottled white wines, promoted by small amounts of oxygen. *Journal of Chromatography A*, 1429, 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.010>

Arroyo-López, F. N., Pérez-Través, L., Querol, A., & Barrio, E. (2011). Exclusion of *Saccharomyces kudriavzevii* from a wine model system mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 28(6), 423-435. <https://doi.org/10.1002/yea.1848>

Aurich, M. K., Paglia, G., Rolfsson, Ó., Hrafnadóttir, S., Magnúsdóttir, M., Stefaniak, M. M., Palsson, B. Ø., Fleming, R. M. T., & Thiele, I. (2015). Prediction of intracellular metabolic states from extracellular metabolomic data. *Metabolomics*, 11(3), 603-619. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0721-3>

Avbelj, M., Zupan, J., & Raspor, P. (2016). Quorum-sensing in yeast and its potential in wine making. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 7841-7852. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7758-3>

Bahut, F., Liu, Y., Romanet, R., Coelho, C., Sieczkowski, N., Alexandre, H., Schmitt-Kopplin, P., Nikolantonaki, M., & Gougeon, R. D. (2019). Metabolic diversity conveyed by the process leading to glutathione accumulation in inactivated dry yeast: A synthetic media study. *Food Research International*, 123, 762-770. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.06.008>

Bakker, B. M., Overkamp, K. M., van Maris, A. J. A., Kötter, P., Luttik, M. A. H., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 15-37. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00570.x>

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243-259. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>

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(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0318-1>

Barrajón, N., Arévalo-Villena, M., Rodríguez-Aragón, L. J., & Briones, A. (2009). Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. *Food Control*, 20(9), 778-783. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.10.002>

Barrajón, N., Capece, A., Arévalo-Villena, M., Briones, A., & Romano, P. (2011). Co-inoculation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains and influence on volatile composition of wines. *Food Microbiology*, 28(5), 1080-1086. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.016>

Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J.-M., Salmon, J.-M., & Barre, P. (1996). Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(2), 145-150. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)85037-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)85037-9)

- Beckner Whitener, M. E., Stanstrup, J., Panzeri, V., Carlin, S., Divol, B., Du Toit, M., & Vrhovsek, U. (2016). Untangling the wine metabolome by combining untargeted SPME–GCxGC-TOF-MS and sensory analysis to profile Sauvignon blanc co-fermented with seven different yeasts. *Metabolomics*, *12*(3). <https://doi.org/10.1007/s11306-016-0962-4>
- Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., & Moreno-Arribas, M. (2017). Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules*, *22*(2), 189. <https://doi.org/10.3390/molecules22020189>
- Bell, S.-J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*(3), 242-295. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
- 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*(2), 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.030>
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozès, N., & Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, *25*(2), 287-293. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00097>
- Bisson, L. F. (1999). *Stuck and Sluggish Fermentations*. *50*(1), 13.
- Blanco, P., Mirás-Avalos, J. M., Pereira, E., & Orriols, I. (2013). Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: Influence of yeast strains on wine chemical and sensory properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(11), 2849-2857. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6122>
- Blanco, P., Mirás-Avalos, J. M., Suárez, V., & Orriols, I. (2013). Inoculation of Treixadura musts with autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains: Fermentative performance and influence on the wine characteristics. *Food Science and Technology International*, *19*(2), 177-186. <https://doi.org/10.1177/1082013212442193>
- Blank, L., Lehmbeck, F., & Sauer, U. (2005). Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Research*, *5*(6-7), 545-558. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.008>
- Blow, N. (2008). Biochemistry's new look. *Nature*, *455*(7213), 697-698. <https://doi.org/10.1038/455697a>
- Boer, V. M., de Winde, J. H., Pronk, J. T., & Piper, M. D. W. (2003). The Genome-wide Transcriptional Responses of *Saccharomyces cerevisiae* Grown on Glucose in Aerobic Chemostat Cultures Limited for Carbon, Nitrogen, Phosphorus, or Sulfur. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(5), 3265-3274. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209759200>
- Bordet, F., Roullier-Gall, C., Ballester, J., Vichi, S., Quintanilla-Casas, B., Gougeon, R. D., Julien-Ortiz, A., Kopplin, P. S., & Alexandre, H. (2021). Different Wines from Different Yeasts? “*Saccharomyces cerevisiae* Intraspecies Differentiation by Metabolomic Signature and

- Sensory Patterns in Wine". *Microorganisms*, 9(11), 2327. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112327>
- Bouix, M., & Leveau, J.-Y. (2001). Rapid Assessment of Yeast Viability and Yeast Vitality During Alcoholic Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 107(4), 217-225. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2001.tb00093.x>
- Bourbouloux, A., Shahi, P., Chakladar, A., Delrot, S., & Bachhawat, A. K. (2000). Hgt1p, a High Affinity Glutathione Transporter from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae**. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13259-13265. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.18.13259>
- 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(2), 843-853. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5411-y>
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 158(1), 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.020>
- Breslow, D. K., Cameron, D. M., Collins, S. R., Schuldiner, M., Stewart-Ornstein, J., Newman, H. W., Braun, S., Madhani, H. D., Krogan, N. J., & Weissman, J. S. (2008). A comprehensive strategy enabling high-resolution functional analysis of the yeast genome. *Nature Methods*, 5(8), 711-718. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1234>
- Brice, C., Cubillos, F. A., Dequin, S., Camarasa, C., & Martínez, C. (2018). Adaptability of the *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to wine fermentation conditions relies on their strong ability to consume nitrogen. *PLOS ONE*, 13(2), e0192383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192383>
- Brice, C., Sanchez, I., Tesnière, C., & Blondin, B. (2014). Assessing the Mechanisms Responsible for Differences between Nitrogen Requirements of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts in Alcoholic Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1330-1339. <https://doi.org/10.1128/AEM.03856-13>
- Cadière, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., & Dequin, S. (2011). Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. *Metabolic Engineering*, 13(3), 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.01.008>
- Cai, H., Hauser, M., Naider, F., & Becker, J. M. (2007). Differential Regulation and Substrate Preferences in Two Peptide Transporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 6(10), 1805-1813. <https://doi.org/10.1128/EC.00257-06>
- Callejon, R. M., Clavijo, A., Ortigueira, P., Troncoso, A. M., Paneque, P., & Morales, M. L. (2010). Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2), 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.09.040>
- Camarasa, C., Grivet, J.-P., & Dequin, S. (2003). Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces*

- cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology*, 149(9), 2669-2678. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26007-0>
- Camarasa, C., Sanchez, I., Brial, P., Bigey, F., & Dequin, S. (2011). Phenotypic Landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation: Evidence for Origin-Dependent Metabolic Traits. *PLoS ONE*, 6(9), e25147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025147>
- 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(2), 485-492. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.001>
- Capone, D. I., Van Leeuwen, K. a., Pardon, K. h., Daniel, M. a., Elsey, G. m., Coulter, A. d., & Sefton, M. a. (2010). Identification and analysis of 2-chloro-6-methylphenol, 2,6-dichlorophenol and indole: Causes of taints and off-flavours in wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), 210-217. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00065.x>
- Carrau, F. M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G., & Henschke, P. A. (2005). De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 243(1), 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.050>
- Casalta, E., Salmon, J.-M., Picou, C., & Sablayrolles, J.-M. (2019). Grape Solids: Lipid Composition and Role during Alcoholic Fermentation under Enological Conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 70, 147-153. <https://doi.org/10.5344/ajev.2018.18049>
- Castellari, M., Sartini, E., Fabiani, A., Arfelli, G., & Amati, A. (2002). Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A*, 973(1-2), 221-227. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01195-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01195-0)
- Castro, C. C., Martins, R. C., Teixeira, J. A., & Silva Ferreira, A. C. (2014). Application of a high-throughput process analytical technology metabolomics pipeline to Port wine forced ageing process. *Food Chemistry*, 143, 384-391. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.138>
- Casu, F., Pinu, F., Stefanello, E., Greenwood, D., & Villas-Boas, S. (2018). The fate of linoleic acid on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism under aerobic and anaerobic conditions. *Metabolomics*, 14, 103. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1399-8>
- Celton, M., Goelzer, A., Camarasa, C., Fromion, V., & Dequin, S. (2012). A constraint-based model analysis of the metabolic consequences of increased NADPH oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 14(4), 366-379. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.03.008>
- Chambers, E., & Koppel, K. (2013). Associations of Volatile Compounds with Sensory Aroma and Flavor: The Complex Nature of Flavor. *Molecules*, 18(5), 4887-4905. <https://doi.org/10.3390/molecules18054887>
- Charoenchai, C., Fleet, G. h., Henschke, P. a., & Todd, B. e. n. t. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3(1), 2-8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x>

- Chen, H. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & Development*, 20(9), 1150-1161. <https://doi.org/10.1101/gad.1411806>
- Cheraiti, N., Guezenc, S., & Salmon, J.-M. (2005). Redox Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in Mixed Culture under Enological Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 255-260. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.255-260.2005>
- Ciani, M., & Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science*, 1, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.07.001>
- Ciani, M., Ferraro, L., & Fatichenti, F. (2000). Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(9), 698-703. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00269-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00269-6)
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., & Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017>
- Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., & Ciani, M. (2021). Yeast Interactions and Molecular Mechanisms in Wine Fermentation: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7754. <https://doi.org/10.3390/ijms22147754>
- Comitini, F., Ingeniis De, J., Pepe, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2004). *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 238(1), 235-240. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09761.x>
- Conacher, C. G., Naidoo-Blossop, R. K., Rossouw, D., & Bauer, F. F. (2020). Real-time monitoring of population dynamics and physical interactions in a synthetic yeast ecosystem by use of multicolour flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(12), 5547-5562. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10607-x>
- Conacher, C. G., Rossouw, D., & Bauer, F. F. B. (2019). Peer pressure: Evolutionary responses to biotic pressures in wine yeasts. *FEMS Yeast Research*, 19(7), foz072. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz072>
- Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A., & Guillamón, J. M. (1997). Analysis of Yeast Populations During Alcoholic Fermentation in a Newly Established Winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(3), 339-344.
- Cooper, H. J., & Marshall, A. G. (2001). Electrospray Ionization Fourier Transform Mass Spectrometric Analysis of Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5710-5718. <https://doi.org/10.1021/jf0108516>
- Crépin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., & Camarasa, C. (2012). Sequential Use of Nitrogen Compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation: A Model Based on Kinetic and Regulation Characteristics of Nitrogen Permeases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(22), 8102-8111. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-12>

- Crépin, L., Sanchez, I., Nidelet, T., Dequin, S., & Camarasa, C. (2014). Efficient ammonium uptake and mobilization of vacuolar arginine by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during wine fermentation. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0109-0>
- Crépin, L., Truong, N. M., Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., & Camarasa, C. (2017). Management of Multiple Nitrogen Sources during Wine Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(5), e02617-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02617-16>
- Cuadros-Inostroza, A., Giavalisco, P., Hummel, J., Eckardt, A., Willmitzer, L., & Peña-Cortés, H. (2010). Discrimination of Wine Attributes by Metabolome Analysis. *Analytical Chemistry*, 82(9), 3573-3580. <https://doi.org/10.1021/ac902678t>
- Curiel, J. A., Morales, P., Gonzalez, R., & Tronchoni, J. (2017). Different Non-*Saccharomyces* Yeast Species Stimulate Nutrient Consumption in *S. cerevisiae* Mixed Cultures. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02121>
- Damon, C., Vallon, L., Zimmermann, S., Haider, M. Z., Galeote, V., Dequin, S., Luis, P., Fraissinet-Tachet, L., & Marmeisse, R. (2011). A novel fungal family of oligopeptide transporters identified by functional metatranscriptomics of soil eukaryotes. *The ISME Journal*, 5(12), 1871-1880. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.67>
- Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., & Piškur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, 14(6), 826-832. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12161>
- Daum, G., Lees, N. D., Bard, M., & Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16), 1471-1510. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199812\)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y)
- Del Barrio-Galán, R., Medel-Marabolí, M., & Peña-Neira, Á. (2016). Effect of different ageing techniques on the polysaccharide and phenolic composition and sensorial characteristics of Chardonnay white wines fermented with different selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *European Food Research and Technology*, 242(7), 1069-1085. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2612-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: Yeast viability in lipid-limited media. *Letters in Applied Microbiology*, 55(5), 338-344. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03301.x>
- Dizy, M., & Bisson, L. F. (2000). Proteolytic Activity of Yeast Strains During Grape Juice Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(2), 155-167.
- Domizio, P., Lencioni, L., Ciani, M., Di Blasi, S., Pontremolesi, C., & Sabatelli, M. P. (2007). Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 281-289. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.052>
- Duc, C., Maçna, F., Sanchez, I., Galeote, V., Delpech, S., Silvano, A., & Mouret, J.-R. (2020). Large-Scale Screening of Thiol and Fermentative Aroma Production during Wine Alcoholic

- Fermentation: Exploring the Effects of Assimilable Nitrogen and Peptides. *Fermentation*, 6(4), 98. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040098>
- Duc, C., Pradal, M., Sanchez, I., Noble, J., Tesnière, C., & Blondin, B. (2017). A set of nutrient limitations trigger yeast cell death in a nitrogen-dependent manner during wine alcoholic fermentation. *PLOS ONE*, 12(9), e0184838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184838>
- Dunn, W. B., Ellis, D. I., Metabonomics, M., Dunn, W. B., & Ellis, D. I. (s. d.). *Spectroscopy; Metabolic fingerprinting; Metabolic profiling; Metabolite*.
- Dupont, S., Beney, L., Ferreira, T., & Gervais, P. (2011). Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(6), 1520-1528. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.11.012>
- Dzialo, M. C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B., & Verstrepen, K. J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp_1), S95-S128. <https://doi.org/10.1093/femsre/ful031>
- Ehrlich, F. (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 40(1), 1027–1047. doi:10.1002/cber.190704001156
- 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>
- Evers, M. S., Roullier-Gall, C., Morge, C., Sparrow, C., Gobert, A., & Alexandre, H. (2021). Vitamins in wine: Which, what for, and how much? *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(3), 2991-3035. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12743>
- Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11-22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)
- Francis, I. I., & Newton, J. I. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 114-126. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00283.x>
- Frick, O., & Wittmann, C. (2005). Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 30. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-30>
- Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., & Tamai, Y. (1997). Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 910-915. <https://doi.org/10.1128/aem.63.3.910-915.1997>
- Gammacurta, M., Marchand, S., Albertin, W., Moine, V., & de Revel, G. (2014). Impact of Yeast Strain on Ester Levels and Fruity Aroma Persistence during Aging of Bordeaux Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(23), 5378-5389. <https://doi.org/10.1021/jf500707e>

- Garcia, D. E., Baidoo, E. E., Benke, P. I., Pingitore, F., Tang, Y. J., Villa, S., & Keasling, J. D. (2008). Separation and mass spectrometry in microbial metabolomics. *Current Opinion in Microbiology*, 11(3), 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.04.002>
- Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. *European Food Research and Technology*, 222(1-2), 15-25. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0029-7>
- Generoso, W. C., Gottardi, M., Oreb, M., & Boles, E. (2016). Simplified CRISPR-Cas genome editing for *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 203-205. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.020>
- 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(2), 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. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02175>
- Goddard, M. R. (2008). Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology*, 89(8), 2077-2082. <https://doi.org/10.1890/07-2060.1>
- Goffeau, A. (1996). 1996: A vintage year for yeast and Yeast. *Yeast*, 12(16), 1603-1606. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199612\)12:16<1603::AID-YEA117>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16<1603::AID-YEA117>3.0.CO;2-Z)
- 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>
- Gougeon, R. D., Lucio, M., Frommberger, M., Peyron, D., Chassagne, D., Alexandre, H., Feuillat, F., Voilley, A., Cayot, P., Gebefugi, I., Hertkorn, N., & Schmitt-Kopplin, P. (2009). The chemodiversity of wines can reveal a metaboecogeography expression of cooperage oak wood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(23), 9174-9179. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901100106>
- Govender, P., Kroppenstedt, S., & Bauer, F. F. (2011). Novel wine-mediated FLO11 flocculation phenotype of commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with modified FLO gene expression: Wine-mediated FLO11 flocculation phenotype. *FEMS Microbiology Letters*, 317(2), 117-126. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02219.x>
- Gurvitz, A., Wabnegger, L., Yagi, A. I., Binder, M., Hartig, A., Ruis, H., Hamilton, B., Dawes, I. W., Hiltunen, J. K., & Rottensteiner, H. (1999). Function of human mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductase and rat monofunctional Delta3-Delta2-enoyl-CoA isomerase in beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochemical Journal*, 344(Pt 3), 903-914.
- Gustafsson, F., Jiranek, V., Neuner, M., Scholl, C., Morgan, S., & Durall, D. (2016). The Interaction of Two *Saccharomyces cerevisiae* Strains Affects Fermentation-Derived Compounds in Wine. *Fermentation*, 2(4), 9. <https://doi.org/10.3390/fermentation2020009>

- Gutiérrez, A., Beltran, G., Warringer, J., & Guillamón, J. M. (2013). Genetic Basis of Variations in Nitrogen Source Utilization in Four Wine Commercial Yeast Strains. *PLoS ONE*, *8*(6), e67166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067166>
- Gutiérrez, A. R., Santamaría, P., Epifanio, S., Garijo, P., & Ópez, R. L. (1999). Ecology of spontaneous fermentation in one winery during 5 consecutive years. *Letters in Applied Microbiology*, *29*(6), 411-415. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1999.00657.x>
- Hansen, M. C., Palmer, R. J., Udsen, C., White, D. C., & Molin, S. (2001). Assessment of GFP fluorescence in cells of *Streptococcus gordonii* under conditions of low pH and low oxygen concentration. *Microbiology*, *147*(5), 1383-1391. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-5-1383>
- Hazelwood, L. A., Daran, J.-M., van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: A Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(8), 2259-2266. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>
- Heard, G. M., & Fleet, G. H. (1986). Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation. *Journal of Applied Bacteriology*, *60*(6), 477-481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01086.x>
- Henry, S. A., Kohlwein, S. D., & Carman, G. M. (2012). Metabolism and Regulation of Glycerolipids in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *190*(2), 317-349. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130286>
- Henschke, P. A. (1993). Yeast-metabolism of nitrogen compounds. *Wine, microbiology and biotechnology*. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10020049470/>
- Herskowitz, I. (1981). Control of cell type in *Saccharomyces cerevisiae*: Mating type and mating-type interconversion. *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, 181-209.
- Hiltunen, J. K., Wenzel, B., Beyer, A., Erdmann, R., Fosså, A., & Kunau, W. H. (1992). Peroxisomal multifunctional beta-oxidation protein of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular analysis of the fox2 gene and gene product. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(10), 6646-6653. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50476-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50476-8)
- Homann, O. R., Cai, H., Becker, J. M., & Lindquist, S. L. (2005). Harnessing Natural Diversity to Probe Metabolic Pathways. *PLoS Genetics*, *1*(6), e80. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010080>
- Howell, K. S., Cozzolino, D., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H., & Henschke, P. A. (2006). Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. *FEMS Yeast Research*, *6*(1), 91-101. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00010.x>
- Hu, K., Zhao, H., Edwards, N., Peyer, L., Tao, Y., & Arneborg, N. (2022). The effects of cell-cell contact between *Pichia kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae* on amino acids and volatiles in mixed culture alcoholic fermentations. *Food Microbiology*, *103*, 103960. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103960>

- Jacques, K. A., Lyons, T. P., & Kelsall, D. R. (2003). *The alcohol textbook: A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries* (4th ed). Nottingham University Press.
- Jin, R., Dobry, C. J., McCown, P. J., & Kumar, A. (2008). Large-Scale Analysis of Yeast Filamentous Growth by Systematic Gene Disruption and Overexpression. *Molecular Biology of the Cell*, 19(1), 284-296. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0519>
- Jiranek, V., Langridge, P., & Henschke, P. A. (1995). Amino Acid and Ammonium Utilization by *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts From a Chemically Defined Medium. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 75-83.
- Julien, A., Roustan, J.-L., Dulau, L., & Sablayrolles, J.-M. (2000). Comparison of Nitrogen and Oxygen Demands of Enological Yeasts: Technological Consequences. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(3), 215.
- KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. <https://www.genome.jp/kegg/>
- 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 Microbiology Letters*, fnv103. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv103>
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(23), 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10829-10837. <https://doi.org/10.1021/jf801695h>
- Kostriken, R., Strathern, J. N., Klar, A. J. S., Hicks, J. B., & Heffron, F. (1983). A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 35(1), 167-174. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90219-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90219-2)
- Kugler, S., Sebghati, T. S., Eissenberg, L. G., & Goldman, W. E. (2000). Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8794-8798. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8794>
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its Importance to Wine Aroma—A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21, 33.
- 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(6), 892-898. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.008>
- Le Guédard, M., Bessoule, J.-J., Boyer, V., Ayciriex, S., Velours, G., Kulik, W., Ejsing, C. S., Shevchenko, A., Coulon, D., Lessire, R., & Testet, E. (2009). PSI1 is responsible for the stearic acid enrichment that is characteristic of phosphatidylinositol in yeast. *The FEBS Journal*, 276(21), 6412-6424. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07355.x>

- Lee, S.-J., Rathbone, D., Asimont, S., Adden, R., & Ebeler, S. E. (2004). *Dynamic Changes in Ester Formation during Chardonnay Juice Fermentations with Different Yeast Inoculation and Initial Brix Conditions*. 9.
- Legras, J.-L., Galeote, V., Bigey, F., Camarasa, C., Marsit, S., Nidelet, T., Sanchez, I., Couloux, A., Guy, J., Franco-Duarte, R., Marcet-Houben, M., Gabaldon, T., Schuller, D., Sampaio, J. P., & Dequin, S. (2018). Adaptation of *S. cerevisiae* to Fermented Food Environments Reveals Remarkable Genome Plasticity and the Footprints of Domestication. *Molecular Biology and Evolution*, 35(7), 1712-1727. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy066>
- Legras, J.-L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., & Karst, F. (2007). Bread, beer and wine : *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*, 16(10), 2091-2102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x>
- Lilly, M., Bauer, F. F., Lambrechts, M. G., Swiegers, J. H., Cozzolino, D., & Pretorius, I. S. (2006). The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*, 23(9), 641-659. <https://doi.org/10.1002/yea.1382>
- Lilly, M., Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 744-753. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.744-753.2000>
- 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(4). <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1001-1>
- Liu, Y., Forcisi, S., Lucio, M., Harir, M., Bahut, F., Deleris-Bou, M., Krieger-Weber, S., Gougeon, R. D., Alexandre, H., & Schmitt-Kopplin, P. (2017). Digging into the low molecular weight peptidome with the OligoNet web server. *Scientific Reports*, 7(1), 11692. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11786-w>
- Ljungdahl, P. O., & Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(3), 885-929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>
- 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>
- Lopes, C. A., Rodríguez, M. E., Sangorrín, M., Querol, A., & Caballero, A. C. (2007). Patagonian wines: The selection of an indigenous yeast starter. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(8), 539-546. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0227-3>
- López, R., Aznar, M., Cacho, J., & Ferreira, V. (2002). Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass

- spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 966(1-2), 167-177. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00696-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00696-9)
- López-Malo, M., Querol, A., & Guillamon, J. M. (2013). Metabolomic Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the Cryotolerant Species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during Wine Fermentation at Low Temperature. *PLoS ONE*, 8(3), e60135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060135>
- Lorang, J. M., Tuori, R. P., Martinez, J. P., Sawyer, T. L., Redman, R. S., Rollins, J. A., Wolpert, T. J., Johnson, K. B., Rodriguez, R. J., Dickman, M. B., & Ciuffetti, L. M. (2001). Green Fluorescent Protein Is Lighting Up Fungal Biology. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 1987-1994. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.1987-1994.2001>
- Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M. T., Barrientos, A., & Côrte-Real, M. (2002). Cytochrome *c* Release and Mitochondria Involvement in Programmed Cell Death Induced by Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 13(8), 2598-2606. <https://doi.org/10.1091/mbc.e01-12-0161>
- Luyt, N. A., Beaufort, S., Divol, B., Setati, M. E., Taillandier, P., & Bauer, F. F. (2021). Phenotypic characterization of cell-to-cell interactions between two yeast species during alcoholic fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(11), 186. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03154-8>
- Magasanik, B., & Kaiser, C. A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290(1-2), 1-18. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00558-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00558-9)
- Malfeito-Ferreira, M., Tareco, M., & Loureiro, V. (1997). Fatty acid profiling: A feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants. *International Journal of Food Microbiology*, 38(2-3), 143-155. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00096-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00096-2)
- Marín-San Román, S., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. P., & Garde-Cerdán, T. (2020). Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds. *Food Research International*, 137, 109712. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109712>
- 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. *Molecular Biology and Evolution*, 32(7), 1695-1707. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv057>
- Martins, C., Brandão, T., Almeida, A., & Rocha, S. M. (2017). Metabolomics strategy for the mapping of volatile exometabolome from *Saccharomyces* spp. Widely used in the food industry based on comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Separation Science*, 40(10), 2228-2237. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601296>
- Mashego, M. R., Rumbold, K., De Mey, M., Vandamme, E., Soetaert, W., & Heijnen, J. J. (2007). Microbial metabolomics: Past, present and future methodologies. *Biotechnology Letters*, 29(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9218-0>
- Maté, M. J., Zamocky, M., Nykyri, L. M., Herzog, C., Alzari, P. M., Betzel, C., Koller, F., & Fita, I. (1999). Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, 286(1), 135-149. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2453>

- Mbuyane, L. L., Bauer, F. F., & Divol, B. (2021). The metabolism of lipids in yeasts and applications in oenology. *Food Research International*, *141*, 110142. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110142>
- 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*(2), 245-250. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012>
- Mencher, A., Morales, P., Curiel, J. A., Gonzalez, R., & Tronchoni, J. (2021). *Metschnikowia pulcherrima* represses aerobic respiration in *Saccharomyces cerevisiae* suggesting a direct response to co-cultivation. *Food Microbiology*, *94*, 103670. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103670>
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Falco, V., Leão, C., & Mendes-Faia, A. (2009). The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *36*(4), 571-583. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0527-x>
- Metlin*.https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage
- Meyerhof, O., P. Ohlmeyer, W. Gentner And H. Maier-Leibnitz, *Biochem.Ztschr.* 298: 396, 1938.
- Miller, M. B. (2001). *Quorum sensing in bacteria*. 37.
- Monod, J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3: 371–394.
- Murtey, M. D., & Ramasamy, P. (2016). Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy – Life Sciences. In M. Janecek & R. Kral (Éds.), *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61720>
- Nasution, O., Lee, Y. M., Kim, E., Lee, Y., Kim, W., & Choi, W. (2017). Overexpression of OLE1 enhances stress tolerance and constitutively activates the MAPK HOG pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, *114*(3), 620-631. <https://doi.org/10.1002/bit.26093>
- Nidelet, T., Brial, P., Camarasa, C., & Dequin, S. (2016). Diversity of flux distribution in central carbon metabolism of *S. cerevisiae* strains from diverse environments. *Microbial Cell Factories*, *15*(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0456-0>
- 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*(4), 331-341. <https://doi.org/10.1002/yea.965>
- Oro, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, *116*(5), 1209-1217. <https://doi.org/10.1111/jam.12446>
- Ortega, C., López, R., Cacho, J., & Ferreira, V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds. *Journal of Chromatography A*, *923*(1-2), 205-214. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00972-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00972-4)

- Palková, Z., Devaux, F., Řičicová, M., Mináriková, L., Le Crom, S., & Jacq, C. (2002). Ammonia Pulses and Metabolic Oscillations Guide Yeast Colony Development. *Molecular Biology of the Cell*, 13(11), 3901-3914. <https://doi.org/10.1091/mbc.e01-12-0149>
- Pallmann, C. L., Brown, J. A., Olineka, T. L., Cocolin, L., Mills, D. A., & Bisson, L. F. (2001). *Use of WL Medium to Profile Native Flora Fermentations*. 7.
- Patel, S., & Shibamoto, T. (2002). Effect of Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae* on Production of Volatiles in Napa Gamay Wine and Petite Sirah Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5649-5653. <https://doi.org/10.1021/jf020337f>
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: The apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 263-269. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- Pereira, C., Mendes, D., Dias, T., Garcia, R., da Silva, M. G., & Cabrita, M. J. (2021). Revealing the yeast modulation potential on amino acid composition and volatile profile of Arinto white wines by a combined chromatographic-based approach. *Journal of Chromatography A*, 1641, 461991. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461991>
- Perez, F., Ramirez, M., & Regodon, J. A. (2001). Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation, *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 393–399, 2001.
- Pereznevado, 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*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.012>
- Pérez-Torrado, R., Rantsiou, K., Perrone, B., Navarro-Tapia, E., Querol, A., & Cocolin, L. (2017). Ecological interactions among *Saccharomyces cerevisiae* strains: Insight into the dominance phenomenon. *Scientific Reports*, 7, 43603. <https://doi.org/10.1038/srep43603>
- Perli, T., Wronska, A. K., Ortiz-Merino, R. A., Pronk, J. T., & Daran, J.-M. (2020). Vitamin requirements and biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 37(4), 283-304. <https://doi.org/10.1002/yea.3461>
- Perrone, B., Giacosa, S., Rolle, L., Cocolin, L., & Rantsiou, K. (2013). Investigation of the dominance behavior of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 165(2), 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.023>
- Petitgonnet, C., Klein, G. L., Roullier-Gall, C., Schmitt-Kopplin, P., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Julien-David, D., & Alexandre, H. (2019). Influence of cell-cell contact between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* on yeast interactions and the exo-metabolome. *Food Microbiology*, 83, 122-133. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.005>
- Pincus, D. H., Orenge, S., & Chatellier, S. (2007). Yeast identification – past, present, and future methods. *Medical Mycology*, 45(2), 97-121. <https://doi.org/10.1080/13693780601059936>
- Pinu, F. (2018). Grape and Wine Metabolomics to Develop New Insights Using Untargeted and Targeted Approaches. *Fermentation*, 4(4), 92. <https://doi.org/10.3390/fermentation4040092>

- Pinu, F. R., Edwards, P. J. B., Gardner, R. C., & Villas-Boas, S. G. (2014). Nitrogen and carbon assimilation by *Saccharomyces cerevisiae* during Sauvignon blanc juice fermentation. *FEMS Yeast Research*, 14(8), 1206-1222. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12222>
- Pinu, F. R., Edwards, P. J. B., Jouanneau, S., Kilmartin, P. A., Gardner, R. C., & Villas-Boas, S. G. (2014). Sauvignon blanc metabolomics: Grape juice metabolites affecting the development of varietal thiols and other aroma compounds in wines. *Metabolomics*, 10(4), 556-573. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0615-9>
- Pizarro, F. J., Jewett, M. C., Nielsen, J., & Agosin, E. (2008). Growth Temperature Exerts Differential Physiological and Transcriptional Responses in Laboratory and Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20), 6358-6368. <https://doi.org/10.1128/AEM.00602-08>
- Pommier, S., Strehaiano, P., & Delia, M. (2005). Modelling the growth dynamics of interacting mixed cultures: A case of amensalism. *International Journal of Food Microbiology*, 100(1-3), 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.010>
- Povhe Jemec, K., Cadez, N., Zagorc, T., Bubic, V., Zupec, A., & Raspor, P. (2001). Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. *Food Microbiology*, 18(3), 247-259. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0396>
- Pretorius, I. S., & Bauer, F. F. (2002). Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends in Biotechnology*, 20(10), 426-432. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02049-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02049-8)
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., & Ramón, D. (1992). Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2948-2953.
- Rajakumari, S., Grillitsch, K., & Daum, G. (2008). Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Progress in Lipid Research*, 47(3), 157-171. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.01.001>
- Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., & Lopez-Ribot, J. L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5459-5463. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5459-5463.2002>
- Raspor, P., Milek, D., Polanc, J., Smolemozina, S., & Cadez, N. (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1-2), 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.017>
- Renault, P. E., Albertin, W., & Bely, M. (2013). An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 4105-4119. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4660-5>
- Ribéreau-Gayon, P. (1991). *Le vin* (Vol. 2606). Presses Universitaires de France-PUF.

- Ribéreau-Gayon, P. (1999). Observations related to the causes and consequences of stuck fermentation in vinification. *OENO One*, 33(1), 39. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.1999.33.1.1041>
- Ribéreau-Gayon, P., Boidron, J. N., & Terrier, A. (1975). Aroma of Muscat grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(6), 1042-1047.
- Richter, C. L., Kennedy, A. D., Guo, L., & Dokoozlian, N. (2015). Metabolomic Measurements at Three Time Points of a Chardonnay Wine Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(3), 294-301. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.14062>
- Rivas-Ubach, A., Liu, Y., Bianchi, T. S., Tolić, N., Jansson, C., & Paša-Tolić, L. (2018). Moving beyond the van Krevelen Diagram: A New Stoichiometric Approach for Compound Classification in Organisms. *Analytical Chemistry*, 90(10), 6152-6160. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00529>
- Rodrigues, M. L., & Casadevall, A. (2018). A two-way road: Novel roles for fungal extracellular vesicles. *Molecular Microbiology*, 110(1), 11-15. <https://doi.org/10.1111/mmi.14095>
- Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., & Mouret, J.-R. (2015). Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(5), 2291-2304. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6210-9>
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., & Divol, B. (2018). Altered Fermentation Performances, Growth, and Metabolic Footprints Reveal Competition for Nutrients between Yeast Species Inoculated in Synthetic Grape Juice-Like Medium. *Frontiers in Microbiology*, 9, 196. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00196>
- Rollero, S., Mouret, J., Bloem, A., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J., Dequin, S., & Camarasa, C. (2017). Quantitative ¹³C-isotope labelling-based analysis to elucidate the influence of environmental parameters on the production of fermentative aromas during wine fermentation. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1649-1662. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12749>
- Romanet, R., Coelho, C., Liu, Y., Bahut, F., Ballester, J., Nikolantonaki, M., & Gougeon, R. (2019). The Antioxidant Potential of White Wines Relies on the Chemistry of Sulfur-Containing Compounds: An Optimized DPPH Assay. *Molecules*, 24(7), 1353. <https://doi.org/10.3390/molecules24071353>
- Romano, P. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 169-180. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00290-3)
- Rosenfeld, E., & Beauvoit, B. (2003). Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20(13), 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*(8), 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*(5). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00383-18>
- Rossouw, D., Næs, T., & Bauer, F. F. (2008). Linking gene regulation and the exo-metabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics*, *9*(1), 530. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-530>
- Roullier-Gall, C., Bordet, F., David, V., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2021). Yeast interaction on Chardonnay wine composition: Impact of strain and inoculation time. *Food Chemistry*, 131732. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131732>
- Roullier-Gall, C., David, V., Hemmler, D., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2020). Exploring yeast interactions through metabolic profiling. *Scientific Reports*, *10*(1), 6073. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63182-6>
- Roullier-Gall, C., Heinzmann, S. S., Garcia, J.-P., Schmitt-Kopplin, P., & Gougeon, R. D. (2017). Chemical messages from an ancient buried bottle: Metabolomics for wine archeochemistry. *Npj Science of Food*, *1*(1). <https://doi.org/10.1038/s41538-017-0001-5>
- Roullier-Gall, C., Lucio, M., Noret, L., Schmitt-Kopplin, P., & Gougeon, R. D. (2014). How Subtle Is the “Terroir” Effect? Chemistry-Related Signatures of Two “Climats de Bourgogne”. *PLoS ONE*, *9*(5), e97615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097615>
- 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*(20), 2983-2990. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.02.054>
- Russell, D. W., Smith, M., & Herskowitz, I. (1986). *Structure of the Saccharomyces cerevisiae HO Gene and Analysis of Its Upstream Regulatory Region*. 6, 14.
- Sachs, M. S. (1996). General and Cross-Pathway Controls of Amino Acid Biosynthesis. In R. Brambl & G. A. Marzluf (Éds.), *Biochemistry and Molecular Biology* (p. 315-345). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-10367-8_14
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, *3*(2), 165-177. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x>
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(2), 454-461. <https://doi.org/10.1128/AEM.01616-07>
- Saerens, S. M. G., Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Voet, A. R. D., Van Dijck, P., Delvaux, F. R., & Thevelein, J. M. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 Genes Encode Novel Enzymes with Medium-chain Fatty Acid Ethyl Ester Synthesis and

- Hydrolysis Capacity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 4446-4456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512028200>
- Sailwal, M., Das, A. J., Gazara, R. K., Dasgupta, D., Bhaskar, T., Hazra, S., & Ghosh, D. (2020). Connecting the dots: Advances in modern metabolomics and its application in yeast system. *Biotechnology Advances*, 44, 107616. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107616>
- 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(2), 154-163. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80054-8](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80054-8)
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., Querol, A., & Guillamón, J. M. (2011). Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(6), 1155-1161. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.03.008>
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., & Marquina, D. (2009). PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*, 155(2), 624-634. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023663-0>
- Schacherer, J., Shapiro, J. A., Ruderfer, D. M., & Kruglyak, L. (2009). Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 458(7236), 342-345. <https://doi.org/10.1038/nature07670>
- Schmitt-Kopplin, P., Hemmler, D., Moritz, F., Gougeon, R. D., Lucio, M., Meringer, M., Müller, C., Harir, M., & Hertkorn, N. (2019). Systems chemical analytics: Introduction to the challenges of chemical complexity analysis. *Faraday Discussions*, 218, 9-28. <https://doi.org/10.1039/C9FD00078J>
- Schreier, P., & Jennings, W. G. (1979). Flavor composition of wines: A review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 12(1), 59-111.
- Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., & Hollender, J. (2014). Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environmental Science & Technology*, 48(4), 2097-2098. <https://doi.org/10.1021/es5002105>
- Scott, W. T., van Mastrigt, O., E. Block, D., A. Notebaart, R., & J. Smid, E. (2021). Nitrogenous Compound Utilization and Production of Volatile Organic Compounds among Commercial Wine Yeasts Highlight Strain-Specific Metabolic Diversity. *Microbiol Spectr* 9:e00485-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00485-21>.
- Shen, H., Heacock, P. N., Clancey, C. J., & Dowhan, W. (1996). The CDS1 Gene Encoding CDP-diacylglycerol Synthase In *Saccharomyces cerevisiae* Is Essential for Cell Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 271(2), 789-795. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.789>
- Sipiczki, M. (2006). *Metschnikowia* Strains Isolated from Botrytized Grapes Antagonize Fungal and Bacterial Growth by Iron Depletion. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6716-6724. <https://doi.org/10.1128/AEM.01275-06>

- Spayd, S. E., Wample, R. L., Evans, R. G., Stevens, R. G., Seymour, B. J., & Nagel, C. W. (1994). Nitrogen Fertilization of White Riesling Grapes in Washington. Must and Wine Composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(1), 34-42.
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 1145-1159. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4>
- Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., Fan, T. W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J. L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A. N., Lindon, J. C., Marriott, P., Nicholls, A. W., ... Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics*, 3(3), 211-221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139-173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.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 Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 1959-1967. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1618-z>
- Tang, J. (2011). Microbial Metabolomics. *Current Genomics*, 12(6), 391-403. <https://doi.org/10.2174/138920211797248619>
- Tatchell, K., & Robinson, L. C. (2002). Use of green fluorescent protein in living yeast cells. In *Methods in Enzymology* (Vol. 351, p. 661-683). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)51876-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)51876-0)
- 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*, 1771(3), 255-270. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.004>
- Tesnière, C. (2019). Importance and role of lipids in wine yeast fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(20), 8293-8300. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10029-4>
- 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(4), e61645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061645>
- Theodoridis, G., Gika, H., Franceschi, P., Caputi, L., Arapitsas, P., Scholz, M., Masuero, D., Wehrens, R., Vrhovsek, U., & Mattivi, F. (2012). LC-MS based global metabolite profiling of grapes: Solvent extraction protocol optimisation. *Metabolomics*, 8(2), 175-185. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0298-z>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and

update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>

Tofalo, R., Perpetuini, G., Fasoli, G., Schirone, M., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2014). Biodiversity study of wine yeasts belonging to the “terroir” of Montepulciano d’Abruzzo “Colline Teramane” revealed *Saccharomyces cerevisiae* strains exhibiting atypical and unique 5.8S-ITS restriction patterns. *Food Microbiology*, 39, 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.001>

Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Fasoli, G., Aguzzi, I., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2013). Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00166>

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., *Traité d’oenologie—Tome 1—6e éd. - Microbiologie du vin. Vinifications* (2012).

Tronchoni, J., Curiel, J. A., Morales, P., Torres-Pérez, R., & Gonzalez, R. (2017). Early transcriptional response to biotic stress in mixed starter fermentations involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.017>

Vaclavik, L., Lacina, O., Hajslova, J., & Zweigenbaum, J. (2011). The use of high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety. *Analytica Chimica Acta*, 685(1), 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.018>

Van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., & Konings, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, function, and biogenesis. *Microbiological Reviews*, 59(2), 304-322.

Varela, C., Schmidt, S. A., Borneman, A. R., Pang, C. N. I., Krömerx, J. O., Khan, A., Song, X., Hodson, M. P., Solomon, M., Mayr, C. M., Hines, W., Pretorius, I. S., Baker, M. S., Roessner, U., Mercurio, M., Henschke, P. A., Wilkins, M. R., & Chambers, P. J. (2018). Systems-based approaches enable identification of gene targets which improve the flavour profile of low-ethanol wine yeast strains. *Metabolic Engineering*, 49, 178-191. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.08.006>

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(4), 2863-2871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.127>

Vaudano, E., & Garcia-Moruno, E. (2008). Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiology*, 25(1), 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.08.001>

Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M. L., Hernández, L. M., & Ramírez, M. (2015). Effects of new *Torulaspora delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01222>

- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Delvaux, F. R. (2003). Yeast flocculation: What brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(3), 197-205. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1200-8>
- Viant, M. R., Kurland, I. J., Jones, M. R., & Dunn, W. B. (2017). How close are we to complete annotation of metabolomes? *Current Opinion in Chemical Biology*, 36, 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.01.001>
- Waché, Y., & Aguedo, M. (2002). Métabolisme des lipides chez la levure : *Catabolisme peroxysomal des acides gras et applications biotechnologiques*. 16.
- Walker, G., Raffaele De Nicola, & Nichola Hall. (2009). Zinc accumulation and utilization by wine yeasts. *International Journal of Wine Research*, 0. <https://doi.org/10.2147/IJWR.S4570>
- Walker, G., & Stewart, G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4), 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- 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(3), 349-359. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01827.x>
- Weill, U., Krieger, G., Avihou, Z., Milo, R., Schuldiner, M., & Davidi, D. (2019). Assessment of GFP Tag Position on Protein Localization and Growth Fitness in Yeast. *Journal of Molecular Biology*, 431(3), 636-641. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.004>
- Werf, M. J. van der, Overkamp, K. M., Muilwijk, B., Coulier, L., & Hankemeier, T. (2007). Microbial metabolomics: Toward a platform with full metabolome coverage. *Analytical Biochemistry*, 370(1), 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.07.022>
- Wiame, J.-M., Grenson, M., & Ars Jr, H. N. (1985). Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Advances in microbial physiology*, 26, 1-88.
- Williams, K. M., Liu, P., & Fay, J. C. (2015). Evolution of ecological dominance of yeast species in high-sugar environments: Evolution of yeast dominance. *Evolution*, 69(8), 2079-2093. <https://doi.org/10.1111/evo.12707>
- Wuster, A., & Babu, M. M. (2009). Transcriptional control of the quorum sensing response in yeast. *Mol. BioSyst.*, 6(1), 134-141. <https://doi.org/10.1039/B913579K>
- Yashiroda, Y., & Yoshida, M. (2019). Intraspecies cell–cell communication in yeast. *FEMS Yeast Research*, 19(7), foz071. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz071>
- Zara, G., van Vuuren, H. J. J., Mannazzu, I., Zara, S., & Budroni, M. (2019). Transcriptomic Response of *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation under Oleic Acid and Ergosterol Depletion. *Fermentation*, 5(3), 57. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030057>
- Zilelidou, E. A., & Nisiotou, A. (2021). Understanding Wine through Yeast Interactions. *Microorganisms*, 9(8), 1620. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081620>

Zinser, E., Paltauf, F., & Daum, G. (1993). Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *Journal of Bacteriology*, 175(10), 2853-2858.

Zupan, J., Avbelj, M., Butinar, B., Kosel, J., Šergan, M., & Raspor, P. (2013). Monitoring of Quorum-Sensing Molecules during Minifermentation Studies in Wine Yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(10), 2496-2505. <https://doi.org/10.1021/jf3051363>

Annexes

Annexe 1: Diversity of methodologies and results in yeast interaction experiments

Species		<i>S. cerevisiae</i> / <i>Metschnikowia pulcherrima</i>								
Matrix		Synthetic Medium						Grape Juice / Must (unspecified color)		
		SGJ	SGJ				SGJ	Grape must		
Sugar Initial concentration (g/L)		200 (Glc 100 Fru 100)	200 (Glc 100 Fru 100)				200 (Glc 100 Fru 100)	231		
YAN / PAN (mg/L)		YAN 410					200	PAN 154 / NH ₃ 22		
Temperature (°C)		25	25				20	25		
Oxygenation		++	-	+	++	+++	+	+		
Inoculation: delay between 2 strains (h)		0	0				0	0		
Ratio Sc/NS		1:1	1:10				1:10	1:1	1:100	1:10000
Sc population	Max	1	3	3	3	3	4	3	2	3
	Dominance		+					2	2	2
	Decrease	-	-	+	+	+	+	-	-	-
NS population	Max	1	1	1	1	1	1	7	1	3
	Decrease	2 or 1	1	3	3	3	-	7	3	3
	Detectable End	No 2 or 4						No 22	No 7	No 7
Fermentation completion							+	+	+	+
Ethanol		=	=	--	--	--	-	--	--	--
Glycerol			++	--	--	--	+	++	++	++
Organic acids	TA							--	--	--
	VA							--	--	--
	LA									
	AA									
Impacting factor		SPE / NS	OX / SPE				SPE	RAT / SPE		
Interaction Mechanism		TOX	COMP				COMP / TOX			
Reference		[51]	[26]				[89]	[61]		

Species	<i>S. cerevisiae</i> / <i>Metschnikowia pulcherrima</i>											
Matrix	Red Grape Juice / Must					White Grape Juice / Must						
	Shiraz	Merlot	Shiraz	Tempranillo	Pinot Grigio	Sauvignon blanc	Riesling	Sauvignon blanc	Chardonnay	Muscat commercial grape juice	Sauvignon blanc	Riesling
Sugar Initial concentration (g/L)	210	240	280 (Glc 140 Fru 140)	245	236	219 (Glc 110 Fru 109)	237	217	240 (Glc 120 Fru 120)	200 (supp)	221 (Glc 112 Fru 109)	225
YAN / PAN (mg/L)	200	190	YAN 170 (supp)	YAN 181	YAN 236	YAN 588	PAN 147	YAN 170 (supp)	260		YAN 378	YAN 250 (supp)
Temperature (°C)	22	22	25		22	20	20	15	22	20	20	20
Oxygenation	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inoculation: delay between 2 strains (h)	24 days	0	96	72	48	48	24	168	24 days	72	48	48
Ratio Sc/NS	1:1	1:10	1:1	1:1	1:1	1:10	10:1	1:1	1:1	1:5	1:10	1:1
Sc population	Max						4			5	3	4
	Dominance		+	+								
	Decrease		-				-	-		-	-	-
NS population	Max											0
	Decrease	+	2	+	+		+	+	+	15	5	4
	Detectable End			No 7	No 4-5		No 8	No 15	No 12	No 25	Low 13	No 8
Fermentation completion	+		17		9	8	+	19	40	10	10	+
Ethanol	--	-	=	--	-	-	--	=	-		-	=
Glycerol	-	++		++	++		++		+		++	++
Organic acids	TA					--		+				--
	VA	+		=	--			++	++			
	LA											
	AA	--	=			=	--	=	++	--		--
Impacting factor	GRA		SPE	SPE	SPE / NS	SPE	SPE	SPE	GRA	SPE / TEMP / DEL / MED	DEL	DEL
Interaction Mechanism										COMP	COMP	
Reference	[173]	[156]	[70]	[56]	[14]	[24]	[158]	[52]	[173]	[40]	[81]	[54]

Species	<i>S. cerevisiae</i> / <i>Starmerella bacillaris</i>										
Matrix	Synthetic Medium	Grape Juice / Must (unspecified color)			White Grape Juice / Must						
	SGJ	Grape must			Macabeo	Erbaluce / dried grape must		Sauvignon blanc	Sauvignon blanc	Muscat (commercial grape juice)	Chardonnay / Muscat / Riesling / Sauvignon blanc
Sugar Initial concentration (g/L)	200 (Glc 100 Fru 100)	231			180	403 (Glc 210 Fru 193)		219 (Glc 110 Fru 109)	217	200 (supp)	245
YAN / PAN (mg/L)	YAN 410	PAN 154 / NH ₃ 22			YAN 115			YAN 588	YAN 170 (supp)		YAN 180 adj
Temperature (°C)	25	25			20	25		20	15	20 / 28	20
Oxygenation	++	+			+	+		+	+	+	+
Inoculation: delay between 2 strains (h)	0	0			0	0 48		24	144	72	48
Ratio Sc/NS	1:1	1:1	1:100	1:10000	1:9	1:1		1:10	1:1	1:5	1:1
Sc population	Max	2 2 10						3		=	
	Dominance	-			-	-		-		-	=
	Decrease	1 3 10			- +						-
NS population	Max	1 2 2						1			
	Decrease	4	7	10 15	+	6 6/12		-	+	-	7
	Detectable End	No 5 / Yes	No 15	No 22 No 22	Low 10				No 14		No 14
Fermentation completion		+ + +			10			7	24		14
Ethanol		-- -- --				-- --		-	=	=	-
Glycerol		++ ++ ++			++	++ ++					++
Organic acids	TA	-- -- --						+			++
	VA	-- -- --									
	LA										
	AA				++	= / -- = / --			++		
Impacting factor	SPE / NS	RAT / SPE			SPE	DEL / SC / NS		SPE	SPE	SPE / TEMP / DEL / MED	GRA / TEMP
Interaction Mechanism	TOX				COMP					COMP	
Reference	[51]	[61]			[30]	[174]		[24]	[52]	[40]	[71]

Species	<i>S. cerevisiae</i> / <i>Starmerella bacillaris</i>															
Matrix	Red Grape Juice / Must															
	Merlot			Barbera		Shiraz	Barbera		Cabernet sauvignon / Merlot / Pinot noir / Shiraz		Kotsifali - Manilari 3:1		Barbera	Nebbiolo	Pinot Grigio	
Sugar Initial concentration (g/L)	240			244		280 (Glc 140 Fru 140)	246		250		220	214		234 (Glu 118 Fru 116)	234 (Glu 115 Fru 120)	236
YAN / PAN (mg/L)						YAN 170 (supp)	YAN 180 adj		YAN 180 adj		YAN 240	YAN 71 + suppl		YAN 180 adj	YAN 180 adj	YAN 236
Temperature (°C)	24			25		25	25		25		25	25		25	25	22
Oxygenation	+			+		++	+ ++		+		+		+		+	+
Inoculation: delay between 2 strains (h)	0	24	48	0	48	96	48		24	48	0	30	0	30	48	48
Ratio Sc/NS	1:5			1:1		1:1	1:1		1:1		1:1		1:1	1:1	1:1	
Sc population	Max															
	Dominance			-			-		= / +		-		+	-	-	
	Decrease					+	-		-		-		-	-	+	
NS population	Max			4												
	Decrease			+		+	4 4		4 4/7		3 8 2 2		7	7	+	
	Detectable End			No 21	Yes 21	No 7	No 14 / 21	No 14 / Yes 21			Low 5 Low 6 Low 7		No 10 / 14	No 9 / Yes 14	Low 5	
Fermentation completion	+	+	+	-	-	17	+ / -	+ / -	7	7/10	6	13				
Ethanol	=	--	--	--	--	=	--	--	--	--	--	--	--	--	= / --	
Glycerol	++ ++			= ++			++ ++		++ ++		= ++ ++ ++		++ ++		++	
Organic acids	TA			++ ++					++		= ++		++			
	VA						++				++		=			
	LA															
	AA						++ +++				++ = =		--			
Impacting factor	NS / DEL			DEL / NS / SC		SPE	OX / NS / SC		DEL / GRA		DEL		SC		SPE / NS	
Interaction Mechanism							COMP				TOX / COMP		Not TOX / Not COMP / CCC			
Reference	[66]			[12]		[70]	[57]		[45]		[31]		[59]	[58]	[14]	

Species	<i>S. cerevisiae</i> / <i>Torulaspota delbrueckii</i>														
Matrix	Synthetic Medium														
	SGJ	WYPD		SGJ	SGJ				SGJ				SGJ	SGJ	
Sugar Initial concentration (g/L)	210 (Glc)	200 (Glc)		210 (Glc)	220 (Glc 110 Fru 110)				200 (Glc 100 Fru 100)				200 (Glc 100 Fru 100)	200 (Glc 100 Fru 100)	
YAN / PAN (mg/L)					YAN 324	YAN 176							YAN 410	200	
Temperature (°C)	25	25		25	20				25				25	20	
Oxygenation	+	++	+	+	+				-	+	++	+++	++	+	
Inoculation: delay between 2 strains (h)	0	0		0	0	0	48	48	0				0	0	
Ratio Sc/NS	1:1	1:1		1:1	1:2	1:20	1:2	1:2	1:10				1:1	1:10	
Sc population	Max	2	1	1	2	2	2	4	5	3	3	3	3	1/3	2
	Dominance	+	+	+	+										
	Decrease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
NS population	Max	2	1	1	1	2	3	3	2	1	1	1	1	1	2
	Decrease	3	-	-	3	3	4	4	2	1	3	3	3	2/3	-
	Detectable End	Low 7			Low 6	Low 5								No 6 / Yes	
Fermentation completion	10			10	7	5	9								
Ethanol					=	=	-	=		=	--	--	--	=	--
Glycerol										++	--	--	--		=
Organic acids	TA														
	VA														
	LA														
	AA					=	=	--							
Impacting factor					RAT / DEL				OX / SPE				SPE / NS	SPE	
Interaction Mechanism	Not TOX / Not COMP / CCC	Not TOX / Not COMP / Not QS / CCC		COMP	Not CCC / Not COMP / TOX				COMP				TOX	COMP / TOX	
Reference	[97]	[33]		[35]	[34]				[26]				[51]	[89]	

Species	<i>S. cerevisiae</i> / <i>Torulaspota delbrueckii</i>							
Matrix	Grape Juice / Must (unspecified color)			White Grape Juice / Must			Red Grape Juice / Must	
	Grape must			Sauvignon blanc	Sauvignon blanc	Riesling	Shiraz	Tempranillo
Sugar Initial concentration (g/L)	231			219 (Glc 110 Fru 109)	217	225	280 (Glc 140 Fru 140)	245
YAN / PAN (mg/L)	PAN 154 / NH ₃ 22			YAN 588	YAN 170 (supp)	YAN 250 (supp)	YAN 170 (supp)	YAN 181
Temperature (°C)	25			20	15	20	25	
Oxygenation	+			+	+	+	++	+
Inoculation: delay between 2 strains (h)	0			24	120	48	96	72
Ratio Sc/NS	1:1	1:100	1:10000	1:10	1:1	1:1	1:1	1:1
Sc population	Max	3	10	3	3		4	
	Dominance	2		15				+
	Decrease	-	-	-	-		15	
NS population	Max	3	3	3	1		0	
	Decrease	3	10	15	-	+	4	+
	Detectable End	No 15	No 22	No 22		14	No 6	No 7
Fermentation completion	+	+	+	7	19	+	17	
Ethanol	--	--	--	-	=	=	=	--
Glycerol	--	--	--			++		++
Organic acids	TA	+	+	+	+	=	--	
	VA	--	--	--	--	=	=	--
	LA							
	AA					-	=	
Impacting factor	RAT / SPE			SPE	SPE	DEL	SPE	SPE
Interaction Mechanism								
Reference	[61]			[24]	[52]	[54]	[70]	[56]

Species		<i>S. cerevisiae</i> / <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>										
Matrix		Synthetic Medium							White Grape Juice / Must			
		SGJ					SGJ	SGJ	Malvasia fina - Arinto	Malvasia fina - Arinto		
Sugar Initial concentration (g/L)		200 (Glc 110 Fru 110)					100	220 (Glc 110 Fru 110)	220 (Glc 110 Fru 110)	234	234	
YAN / PAN (mg/L)											YAN 175 / 387 (supp)	YAN 387
Temperature (°C)		18						20	25	20	20	
Oxygenation		+						+	+	+	+	
Inoculation: delay between 2 strains (h)		0						0	0	0	0	
Ratio Sc/NS		1:1	3:1	1:2	1:10	1:100	1:10	1:1	1:1	1:1	1:1	
Sc population	Max	2	3	7	7	7			2	1	1	
	Dominance											
	Decrease	-	-	-	-	-		-	-	-	-	
NS population	Max	1			3	3			2	1	1	
	Decrease	1	+	1	4	15	7	+	2	2	6	
	Detectable End	No 7	No 3	No 8	No 11	No 23	Yes 34	Low 4	No 4	No 12	Low 10	
Fermentation completion		20	20	25	25	25		+	9	+		
Ethanol												
Glycerol												
Organic acids	TA											
	VA											
	LA											
	AA											
Impacting factor		RAT									MED	
Interaction Mechanism		TOX / Not COMP						TOX		Not COMP		
Reference		[36]						[79]	[93]	[32]	[107]	

Species	<i>S. cerevisiae</i> / <i>Hanseniaspora uvarum</i>			
Matrix	Synthetic Medium			White Grape Juice / Must
	SGJ	SGJ	SGJ	Macabeo
Sugar Initial concentration (g/L)	200 (Glc 110 Fru 110)	200 (Glc 100 Fru 100)	200 (Glc 100 Fru 100)	180
YAN / PAN (mg/L)		YAN 410	YAN 200	YAN 114.6
Temperature (°C)	18	25	20	20
Oxygenation	+	++	+	+
Inoculation: delay between 2 strains (h)	0	0	0	0
Ratio Sc/NS	4:1	1:1	1:10	1:9
Sc population	Max	2		1
	Dominance			
	Decrease	-		8
NS population	Max		1	1
	Decrease	1	2	1
	Detectable End	No 3	No 4	Low 10
Fermentation completion	18			+
Ethanol		=	+	=
Glycerol			-	++
Organic acids	TA			
	VA			
	LA			
	AA			++
Impacting factor	RAT	SPE / NS	SPE	SPE
Interaction Mechanism	TOX / Not COMP	TOX	COMP / TOX	COMP
Reference	[36]	[51]	[89]	[30]

YAN = yeast assimilable nitrogen / PAN = primary amino nitrogen. Sc = *S. cerevisiae* / NS = Non-*Saccharomyces* TA = total acidity / VA = volatile acidity / LA = lactic acid / AA = acetic acid. SGJ = Synthetic Grape Juice / Glc = Glucose / Fru = Fructose / WYPD = Yeast Peptone Dextrose medium modified for wine fermentation / Supp = with supplementation / Oxygen: - = anaerobia, +/- semi-anaerobia, low oxygenation, + = semi-anaerobia, ++ aerobia, +++ aerobia, with higher oxygenation. Population columns: Max = maximal population reached by day x / Dominance: + = dominance of *S. cerevisiae*, = similar populations, "x" = dominance obtained after x days / Decrease = decrease since day x / Low = low population since day x / No = population not detectable since day x / Yes = population still detectable at day x. Fermentation completion: x = reached at day x, +/- = reached/not reached during experimentation. Ethanol, glycerol and organic acids are compared to Sc pure culture: ++ high increase, + increase, +/- slight decrease, = no change, - decrease, -- high increase. Impacting factors: inoculation delay (DEL), inoculation ratio between *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast (RAT), yeast species (SPE), yeast strain *S. cerevisiae* (SC) or non-*Saccharomyces* (NS), medium composition (MED), grape nature (GRA), temperature (TEMP), oxygenation (OX), type of reactor (lab, pilot, industrial) (REAC). Interaction mechanism: involvement of quorum sensing mechanisms (QS), toxic compounds (including ethanol, antimicrobial peptides) (TOX), competition for nutrient (including oxygen) (COMP), cell-cell contact mechanisms (CCC) / No = mechanism involvement has been ruled out by the study

Annexe 2 : Liste de composés références pour la calibration interne suite à l'analyse FT-ICR-MS

Composé	Formule	m/z
	C ₁₂ H ₂₃ O ₂	199.170354
	C ₁₀ H ₁₄ NO ₂ S	212.075070
	C ₁₄ H ₂₇ O ₂	227.201654
	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	255.232950
	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	283.264254
	C ₂₀ H ₃₉ O ₂	311.295554
	C ₂₂ H ₄₃ O ₂	339.326854
	C ₂₄ H ₄₇ O ₂	367.358154
	C ₃₀ H ₄₅ O ₈	533.311990
Dicatéchine	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	577.135150
	C ₃₇ H ₄₉ O ₁₁	669.328040
Tricatéchine		865.198538
Acide tartrique	C ₄ H ₆ O ₆	149.00916
Resvératrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	227.071368
Acide gallique	C ₇ H ₆ O ₅	169.014247
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	179.056112
Fructose	C ₆ H ₁₂ O ₆	163.061197
Glutathion	C ₁₀ H ₁₆ N ₃ O ₆ S	306.076530
Acide caftarique	C ₁₃ H ₁₁ O ₉	311.040856
Quercetin	C ₁₅ H ₉ O ₇	301.035376
Kaempférol	C ₁₅ H ₉ O ₆	285.040462
Quercétine-3-glucoside	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.088200
Quercétine-3-glucoronide	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	477.067464
Epicatéchine-3-o-gallate	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₀	441.082720
Acide digallique	C ₁₄ H ₉ O ₉	321.025205
Malvidine	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₇	654.180148



Titre : Interactome entre micro-organismes au cours de la fermentation alcoolique des vins

Mots clés : levures, vin, interactions, *S. cerevisiae*, métabolomique, analyses sensorielles

Résumé : L'étude des interactions mises en jeu entre micro-organismes est d'intérêt majeur en œnologie pour diverses applications dont la modulation du profil aromatique des vins. Dans cette démarche, les interactions entre levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* sont largement décrites dans la littérature. Au contraire, les interactions au cours de la fermentation alcoolique entre souches de *S. cerevisiae*, reconnue pour ses propriétés technologiques en œnologie, sont peu étudiées.

Dans le cadre de ces travaux, douze souches de *S. cerevisiae* et leur impact sur le vin ont été caractérisés en culture pure selon une démarche intégrative qui combine des approches microbiologique, chimique, métabolomique et sensorielle. Une importante diversité intraspécifique a été mise en évidence conduisant à des vins de compositions chimiques spécifiques, aux profils sensoriels distincts. Quatre de ces douze souches ont été sélectionnées pour leurs différences d'empreintes métabolomique et sensorielle en vue de l'étude des interactions intervenant entre souches de *S. cerevisiae*. Afin de discriminer des souches d'une même espèce en cytométrie en flux, outil de choix pour suivre en temps réel une cinétique de croissance, un gène codant pour une protéine fluorescente a été intégré par CRISPR-Cas9 au sein du génome de l'une des quatre souches sélectionnées. Même si aucun impact phénotypique n'a été observé l'intégration de ce gène a eu un effet notable à l'échelle du métabolome et principalement du peptidome. 102 biomarqueurs spécifiques de la souche modifiée

ou dont l'intensité a été significativement modulée ont été extraits. La souche modifiée a été intégrée au sein de co-cultures avec chacune des trois autres souches de *S. cerevisiae* sélectionnées. Ces trois co-cultures ne présentent pas de différence de dynamique de populations. En revanche, leur association pour mener la fermentation alcoolique conduit à des vins de compositions chimiques différentes de ceux issus des cultures pures associées. Par ailleurs, les vins issus des co-cultures se sont remarquablement distingués (métabolomique et sensoriel) des assemblages de vins des cultures pures correspondantes. Au regard du volatilome, les familles des esters, des acides gras et des phénols ont été affectées par la co-culture. La spectrométrie de masse à haute résolution a permis de révéler des centaines de biomarqueurs spécifiques des cocultures. Les voies métaboliques impliquées dans ces changements de composition du vin ont été mises en évidence et la plupart appartiennent au métabolisme de l'azote incluant les voies du métabolisme des acides aminés, dont celui du tryptophane ou encore de la phénylalanine. Ainsi, des phénomènes d'interactions non neutres ont été mis en évidence. Il est à noter que les mécanismes diffèrent selon les souches en présence. Il est nécessaire de prendre en compte ces phénomènes lors de l'association de deux souches dont les impacts ne peuvent être définis uniquement selon les dynamiques de populations. La compréhension de ces phénomènes permettra d'optimiser le recours à l'utilisation de levains mixtes de *S. cerevisiae* en œnologie.

Title: Interactome between microorganisms during alcoholic fermentation

Keywords: yeast, wine, *S. cerevisiae*, metabolomic, sensory analysis

Abstract: The study of interactions between microorganisms is of major interest in oenology for various applications, including the modulation of the aromatic profile of wines. The interactions between *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts are widely described in the literature. On the contrary, interactions during alcoholic fermentation between *S. cerevisiae* strains, known for their technological properties in oenology, have been little studied.

In this work, twelve strains of *S. cerevisiae* and their impact on wine were characterized in pure cultures using an integrative approach that combines microbiological, chemical, metabolomic and sensory approaches. An important intraspecific diversity was highlighted, leading to wines with specific chemical compositions and distinct sensory profiles. Four of these twelve strains were selected for their different metabolomic and sensory fingerprints in order to study the interactions between *S. cerevisiae* strains. To discriminate between strains of the same species using flow cytometry, tool of choice for real-time monitoring of growth kinetics, a gene coding for a fluorescent protein was integrated by CRISPR-Cas9 into the genome of one of these four selected strains. Although no phenotypic impact was observed, the integration of this gene had a significant effect on the metabolome and mainly the peptidome. 102 biomarkers specific to the modified strain

or whose intensity was significantly modulated were revealed. The modified strain was integrated into co-cultures with each of the other three selected *S. cerevisiae* strains. These three co-cultures did not differ in population dynamics. On the other hand, their association to conduct alcoholic fermentation leads to wines with different chemical compositions than those from the associated pure cultures. Moreover, the wines from the co-cultures were remarkably different (metabolomically and sensorially) from the wine blends issued of the pure cultures. Esters, fatty acids and phenol families were affected by coculture regarding volatile compounds. High resolution mass spectrometry allowed to revealed thousands of coculture biomarkers. Metabolic pathways involved in these wine composition changes were highlighted and most belong to nitrogen metabolism including the pathways of amino acid metabolism, such as tryptophan and phenylalanine. Thus, non-neutral interaction phenomena were highlighted. It should be noted that interaction mechanisms differ according to the strains involved. It is necessary to take into account these phenomena when associating two strains whose impacts cannot be defined only according to the population dynamics. Understanding these phenomena will allow to optimize the use of mixed *S. cerevisiae* starter cultures in oenology.