



HAL
open science

Développement d'une communauté modèle de levures œnologiques

Eléonore Pourcelot

► **To cite this version:**

Eléonore Pourcelot. Développement d'une communauté modèle de levures œnologiques. Alimentation et Nutrition. Université de Montpellier, 2023. Français. NNT : 2023UMONG107 . tel-04721828

HAL Id: tel-04721828

<https://theses.hal.science/tel-04721828v1>

Submitted on 4 Oct 2024

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Sciences des Aliments et Nutrition

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

Unité de recherche Sciences Pour l'Œnologie

Développement d'une communauté modèle de levures œnologiques

Présentée par **Eléonore POURCELOT**
Le 24 Novembre 2023

Sous la direction de **Virginie GALEOTE** et **Thibault NIDELET**

Devant le jury composé de

Mme Sabine SCHORR-GALINDO, Professeure, Université de Montpellier, Montpellier
Mme Raphaëlle TOURDOT-MARECHAL, Professeure, Université de Bourgogne, Dijon
Mr Aymé SPOR, Chargé de Recherche, INRAE, Dijon
Mr Emmanuel COTON, Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Brest
Mme Virginie GALEOTE, Chargée de Recherche, INRAE, Montpellier
Mr Thibault NIDELET, Chargé de Recherche, INRAE, Montpellier

Présidente du jury
Rapporteuse
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
Co-encadrant de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

“ Feeling that there was in this something of surpassing interest, I felt so excited that I began striding up and down the room and even went to the seashore in order to collect my thoughts.”

Elie Metchnikoff

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants Thibault Nidelet et Virginie Galeote pour m'avoir offert l'opportunité de travailler sur ce sujet de thèse. J'ai beaucoup appris grâce à vous pendant ces trois années. Merci de m'avoir apporté votre expertise, mais aussi votre soutien et votre compréhension tout au long de cette thèse et grâce auxquels j'ai pu m'épanouir. Ce fût un très grand plaisir de travailler avec vous.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury, Raphaëlle Tourdot-Marechal, Aymé Spor, Emmanuel Coton et Sabine Schorr-Galindo, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie également Isabelle Masneuf-Pomarede, Jérôme Hamelin et Fabienne Remize d'avoir participer aux comités de thèse.

Un grand merci général à toutes les personnes de l'UMR pour m'avoir accueillie pendant ces trois années. J'espère que je n'oublierai personne.

Merci à Thérèse Marlin pour ta participation sur toutes les manips de biologie moléculaire. Tu as su y apporté la rigueur qui me manque parfois, et je n'aurais pas pu autant avancer sans ton aide sur la construction des souches. C'était également un plaisir de discuter avec toi de culture asiatique.

Merci à Diego Segond pour ton aide sur les différentes manips, de la cytométrie au lancement du robot, en passant par les manips en microplaque. Le cytomètre nous aura parfois donné bien du fil à retordre, mais je pense qu'on a à peu près dompté la bête maintenant... Enfin, jusqu'au prochain blocage de la porte.

Merci à Faiza Macna, pour toutes les analyses HPLC que tu as réalisées. Merci également à Christian Picou pour m'avoir expliqué le fonctionnement des différentes méthodes de suivi de fermentation. Et merci à Céline Serre de s'occuper des dernières fermentations de ce projet.

Merci à Florian Bauer et Cleo Conacher pour m'avoir accueillie au laboratoire de Stellenbosch pendant deux mois, ainsi que pour les nombreux échanges scientifiques dès le début du projet.

Merci également à Delphine Sicard, Jean-Luc Legras, Carole Camarasa, Audrey Bloem et Cécile Neuvéglise, avec qui les échanges sont toujours constructifs et enrichissants.

Je souhaiterais remercier Olivier, le « dieu de la PCR », et sans qui aucune de mes PCR n'aurait jamais fonctionné je crois. Merci pour ta disponibilité au labo et pour avoir répondu

à toutes les questions que je venais te poser. Merci aussi pour ta bonne humeur communicative et l'attention que tu portes aux personnes qui t'entourent.

Evidemment, je remercie vivement Irene, pour ton expertise et ton aide sur de nombreux points techniques. Tu es une grande source d'inspiration, à la fois pour ton professionnalisme et pour ta bienveillance. Je remercie également Carmen, pour ta passion communicative et ta détermination.

Un grand merci aussi à Ludovic, pour ton aide au labo, et les discussions de sciences ou de fermentation. Ma biblio aurait été bien plus pauvre sans ton aide. Merci aussi de t'être préoccupé de ma vie sociale ! Merci à Julie, avec qui j'ai pu partager mon appréciation « mitigée » de *Metschni* et la passion des transfos.

Je voudrais ensuite remercier mes différents compagons de bureau. Cécile et Saul, du bureau de la win 001, merci pour les discussions passionnantes sur nos sujets respectifs et pour les nombreux fous rires ! Merci aussi d'avoir été présents dans les moments de doute. Merci à Lucie Arnould qui m'a accueillie avec beaucoup de gentillesse. Et merci à Rémi, Alice et Laurie qui m'ont vu débarquer du jour au lendemain et avec qui j'ai partagé la dernière ligne droite de la rédaction. Saul, tu n'auras plus besoin de venir nous rappeler que c'est l'heure de rentrer chez nous.

Plus généralement, je souhaiterais remercier Jessica Noble, Martine Pradal, Cécile Grondin, Hugo Devillers, Anita Boidevin, Stéphane Guezenec, Agnès Ageorges et l'ensemble des personnes qui m'ont aidée et conseillée au cours de cette thèse. Merci aux différentes personnes de la pause café, Somaya, Teddy, Valérie, Soline... Je remercie évidemment Angèle, d'avoir apporté tant de bonne humeur, autour de conversations parfois un peu absurdes. Merci de m'avoir embarqué pour une deuxième saison des Apprentis Chercheurs, pendant laquelle on a même isolé de la « levure de nuage » !

Merci aux différents doctorants avec qui j'ai toujours eu plaisir à discuter, Laurianne, Giovanna, Rafa, Gabriel, Josie, Charlie, Léa, Luca, sans oublier les « nouveaux », Tristan, Laura, Hippolyte, Rachelle. Merci à Manon, doctorante qui m'a formée quand j'étais en stage et qui a maintenant rejoint l'équipe pour de nouveaux projets !

Merci aux différents stagiaires et doctorants de passage. Merci d'abord à Audrey, la meilleure stagiaire ! J'ai été très contente de faire les dernières manip avec toi, en musique et en bruitage. Merci également à Alanna, Ophélie, Sylvia, Carole, Bartosz, Anna, James, Ella,

Lydia, Julie, Beatrice, Flavia, Héloïse, Apolline, Giulia, Xavière... Merci aussi aux différentes personnes du « Yeast Lab », Rene, Irmela, Santhuri, Justin, Samantha, Georgia, Louisa, ... pour leur accueil. Merci aussi à Carnelia pour les aventures que nous avons partagées.

Je souhaiterais aussi exprimer ma reconnaissance envers les petites choses qui font le quotidien, l'énergie de la musique, la sérénité de la nuit, la beauté du ciel ou le calme de la mer, ainsi que les personnes qui nous inspirent, les artistes ou les écrivains. Et les chats ! Fripouille, Marcel, et Toshiba.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement mes amies et ma famille. Un grand merci à Tiffany, ton enthousiasme et ta sensibilité sont toujours une source d'inspiration et de motivation. Merci également à Carole et Chloé pour leur amitié. Je remercie tout particulièrement ma maman, pour son soutien à toute épreuve et sa bienveillance, et ma sœur Asceline, aka « Lumière », pour les nombreuses visios travail, mais aussi doléances. Merci également à mon frère Tristan, pour tous ses conseils, et mon père. J'ai une pensée émue pour Monique.

Table des matières

Liste des figures	11
Liste des annexes	17
Liste des tableaux	15
Liste des communications	18
Liste des abréviations	19
Introduction générale	21
Introduction bibliographique	25
I. Principe et enjeux actuels en œnologie	26
1. Principe de la fermentation	26
2. S'adapter aux changements climatiques	28
3. Répondre aux nouvelles attentes des consommateurs	29
II. Diversité des micro-organismes en œnologie	31
1. La fermentation, un processus dynamique	31
2. Paramètres déterminant la diversité microbienne	34
a. Facteurs environnementaux	34
b. Pratiques vitivinicoles	36
3. Diversité génétique des principales espèces de levures en œnologie	38
a. Spécificités génétiques	38
b. Structure des populations des principales levures œnologiques	40
4. Propriétés œnologiques des levures	41
a. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
b. <i>Torulaspota delbrueckii</i>	42
c. <i>Lachancea thermotolerans</i>	43
d. <i>Hanseniaspora uvarum</i>	44
e. <i>Starmerella bacillaris</i>	44
f. <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	45
g. <i>Pichia kudriavzevii</i>	46
5. Applications des non- <i>Saccharomyces</i> en œnologie	48
III. Méthodes de suivi de dynamique des communautés	51
1. Échantillonnage	51
2. Méthodes cultures-dépendantes	52
3. Méthodes cultures-indépendantes	53
4. Cytométrie en flux	54
IV. Interactions au sein des communautés microbiennes	56
1. Définitions	56
2. Interactions observées pendant la fermentation alcoolique du vin	58
a. Compétitions pour les nutriments	58
b. Libération de composés toxiques ou inhibiteurs	60
c. Interactions contact-dépendantes	61
3. Communautés synthétiques	63
a. Définitions	63
b. Applications des communautés synthétiques	64
c. Exemples des communautés modèles en œnologie	65

V. Objectifs	67
Chapitre 1 : Comparaison de la hiérarchie des interactions inter- et intraspécifiques en co-culture	69
Chapitre 2 : Importance de la souche lors de fermentations en consortia	93_Toc156921965
Introduction	97
Material and methods	98
Results	102
a. Initial inter- and intraspecific phenotypic diversity	104
b. Fermentation performances of consortia	107
Discussion	112
Analyse complémentaire	126
Chapitre 3 : Caractérisation fermentaire d'une communauté de six espèces de levures œnologiques	129
Introduction	132
Materials and methods	133
Results and discussion	139
a. Construction of consortium and method optimization	139
b. Fermentation kinetics and population dynamics of the consortium	142
Declaration of interests	149
Acknowledgements	149
Supplementary Data	150
References	158
Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique	164
Introduction	167
Materials and Methods	168
Results and Discussion	172
a. Effect of osmotic stress on fermentation performance	172
b. Effect of osmotic stress on population dynamics	175
c. Differences in metabolite production balance	179
a. Effect of initial composition on consortia behavior.	181
Résultats complémentaires	202
Discussion générale & Perspectives	206
Annexes	216
Références bibliographiques	219

Liste des figures

Introduction bibliographique

- Figure 1** : Comparaison schématique de la cinétique de maturation des baies de raisin en conditions idéales (A) et dans des conditions de températures plus élevées (adapté de Ubeda et al., 2020). _____ 29
- Figure 2** : Schéma simplifié de la dynamique microbienne et de l'évolution métabolique lors de la vinification. **A** : Cinétique de consommation des sucres, sources d'azote assimilable et d'acide malique, et production d'éthanol et acide lactique. **B** : Evolution schématique des différentes populations (levures, bactéries, champignons filamenteux) **C** : Description des principaux genres de micro-organismes isolés aux principales étapes de vinification : moût, début de fermentation alcoolique, milieu de fermentation alcoolique, fermentation malolactique (adapté de Conacher et al. 2019 ; Krieger-Weber et al. 2020). _____ 32
- Figure 3** : Fréquence d'isolement de chaque espèce dans la littérature scientifique consacrée à l'étude de communautés naturelles en milieu œnologique (18 articles inclus). En bleu sont représentées les espèces étudiées dans ce travail de thèse. _____ 34
- Figure 4** : Principaux facteurs environnementaux influençant la diversité microbienne dans le moût et représentation schématique des variations de richesse et d'uniformité des espèces dans 3 conditions hypothétiques différentes (A, B et C). _____ 36
- Figure 5** : Schéma des régions du complexe des gènes ribosomiaux. La localisation des amorces les plus communément utilisées pour l'amplification des ITS ou domaine D1/D2 est indiquée par des flèches. (Adapté de Arbefeville et al. 2017) _____ 53
- Figure 6** : Principe de la cytométrie. Le système se divise en trois composantes : optique (configuration des lasers et filtres), fluïdique (transport de l'échantillon) et électronique (détection et analyse des signaux). PMT : Photo Multiplier Tube. (Adapté de Longin et al. 2018). _____ 55
- Figure 7** : Classification des interactions selon que celles-ci sont positives (+), neutres (0) ou négatives (-) pour chacun des deux organismes impliqués (Faust et Raes 2012, avec la permission de Springer Nature) _____ 57
- Figure 8** : Les interactions d'ordre supérieur correspondent à des modifications non prédictibles à partir d'interactions par paires du phénotype (A) ou de la fitness (B) des espèces (adapté de Ludington 2022). _____ 58
- Figure 9** : Schéma des différents mécanismes d'interaction identifiés entre levures (adapté de Ciani et Comitini 2015 et Conacher et al. 2019). _____ 62

Chapitre 1

- Supplementary Figure 1**: Heatmap of the growth rate (r): positive index means a higher growth rate so a positive interaction. * denotes cocultures whose growth rate is significantly different from the growth rate of both monocultures. Un denotes underyielding (latency time significantly longer than both monocultures), Ov denotes overyielding. _____ 89
- Supplementary Figure 2** : Heatmap of the latency index: positive index means a longer latency time so probably related to negative interactions. * denotes cocultures whose latency is significantly different from the average latency of both monocultures. Un denotes underyielding (latency time significantly longer than both monocultures). No overyielding was observed for the latency. _____ 90
- Supplementary Figure 3**: Heatmap of the maximum population (=MaxOD600): positive index means a higher maximum population so related to positive interactions. * denotes cocultures whose maximum population is significantly different from the average maximum population of both monocultures. Un denotes underyielding (latency time significantly longer than both monocultures) _____ 91

Chapitre 2

- Figure 1**: PCA analysis for monoculture fermentation of the 18 non-Saccharomyces strains. **A**: Plot of variables. Y stands for yield, SugRatio corresponds to the ratio between consumed glucose and consumed fructose, tF = time needed to stop fermentation (CO_2 rate < 0.02 g/L/h), Latency = time needed to reach 5 g/L of CO_2 , Vmax = maximum release rate of CO_2 . **B**: Plot of individuals, representing the average of triplicates for each strain. The

data of single strain fermentation of *S. cerevisiae* (Sc) and consortia (grey triangles) were later projected on the PCA plot, without being considered in the dimension computing. Data were scaled before the PCA. Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Pku: *Pichia kudriavzevii*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Td: *Torulaspora delbrueckii*. _____ 105

Figure 2: Variability in fermentation kinetics between species and strains. Latency = time needed to reach 5 g/L of CO₂ (in h), MaxCO₂ = total quantity of produced CO₂ (in g/L), tF = time needed to stop fermentation (when CO₂ rate < 0.02 g/L/h, in h), Vmax = maximum release rate of CO₂ (in g/L/h), tVmax = time when Vmax is reached (in h). Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Pku: *Pichia kudriavzevii*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Td: *Torulaspora delbrueckii*. _____ 106

Figure 3: Yield for metabolites at the end of monoculture fermentations. Error bars indicate standard error. Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Pku: *Pichia kudriavzevii*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Td: *Torulaspora delbrueckii*. _____ 107

Figure 4: Fermentation kinetics parameters. Latency: time to reach 5g/L of accumulated CO₂. tF: time to stop the fermentation (CO₂ rate < 0.02 g/L/h). Vmax: maximum CO₂ rate. YCO₂: yield in CO₂ (CO₂ produced in g/sugar consumed in g). p-value indicates the result of an ANOVA test run on the nine consortia. Sc is given for comparison purposes and was not included in the statistical analysis. _____ 109

Figure 5: Concentration in g/L of different metabolites at the end of fermentation. Consortia C1 to C9, as well as *S. cerevisiae* monocultures were compared by ANOVA. The letters indicate the statistical group of each consortium as given by the post-hoc Tukey test. Error bars indicate the standard error. _____ 110

Figure 6: Population dynamics parameters in the different consortia. t50Sc: time needed for *S. cerevisiae* to reach 50% of the live cells (in h). t50Dead: time needed to reach a mortality of 50% of the total cells (*S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces*) in consortia. _____ 111

Figure 10 : Comparaison de l'ensemble des paramètres étudiés des différents consortia par rapport à la moyenne entre consortia (indiquée par la ligne pointillée). _____ 126

Supplementary Figure 1: Frequency of isolation of the most common yeast species in must or grape in 18 survey papers worldwide. **B:** Proportion of yeast species included in this study, from 13 survey papers. The boxplot and black dots refer to the relative abundance of the different species in natural must. In blue are indicated the relative abundance used in this study. Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Pku: *Pichia kudriavzevii*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Td: *Torulaspora delbrueckii*. _____ 115

Supplementary Figure 2: Comparison of the growth parameters of the *S. cerevisiae* WT (ScWT) strain and the mCherry-tagged strain (Sc4798) in SGM425 and YPD, during microplate growth assay. auc_l: area under the curve, k: maximum OD600nm, r: growth rate. Figures on the plot indicate the p-value of the T-test comparing both strains. _____ 116

Supplementary Figure 3: Comparison of fermentation parameters of the *S. cerevisiae* WT (ScWT) strain and the mCherry-tagged strain (Sc4798). **A:** Cell growth (lines) and viability (bars) of both strains during fermentation in SGM425 at 24°C. **B:** Metabolic yields and CO₂ kinetics parameters for both strains. Y stands for yield, SugRatio corresponds to the ratio between consumed glucose and consumed fructose, tF = time needed to stop fermentation (CO₂ rate < 0.02 g/L/h), Latency = time needed to reach 5 g/L of CO₂, Vmax = maximum release rate of CO₂. _____ 117

Supplementary Figure 4: Residual fructose and glucose when fermentation for the different strains. Strains are ordered with increasing total residual sugar. Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Pku: *Pichia kudriavzevii*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Td: *Torulaspora delbrueckii*. _____ 118

Supplementary Figure 5: Microbial dynamics in the different consortia expressed in log(cells/mL). Black solid line: total population; dashed orange line: live cells of *S. cerevisiae*; green dashed line: total dead cells. _____ 119

Chapitre 3

Figure 1: Cytometry set up with an example of a sample at inoculation. **A:** VL2 (600DLP-620/15)/BL1 (495DLP-530/30) dot plot is used to separate GFP positive and mCherry positive cells. **B:** VL2 (495DLP-512/25)/SSC dot plot derived from the GFPPos gate on A, is used to separate mCitrine (-) from eGFP signal (+). **C:** VL1 (417LP-440/50)/SSC dot plot derived from the GFPNeg gate on A, is used to separate non-fluorescent cells from BFP positive cells. **D:** Hierarchy of gating and percentage of each population. % Total indicates the % of the total population of events in the corresponding gate. _____ 141

Figure 2: Comparison of observed population and theoretical population in mock communities. Linear equations between observed and theoretical populations are indicated for each species. Dashed line: $\log_{10}(\text{Observed cell number}) = \log_{10}(\text{Theoretical cell number})$. Overall correlation (Pearson): $R^2 = 0.95$, $p < 0.001$. Hu: Hanseniaspora uvarum, Lt: Lachancea thermotolerans, Mp: Metschnikowia pulcherrima, Sb: Starmerella bacillaris, Sc: Saccharomyces cerevisiae, Td: Torulaspora delbrueckii. _____ 142

Figure 3: Fermentation kinetics of monocultures and consortium C4. **A:** CO₂ production rate kinetics of each monoculture (solid line) and consortium C4 (dashed line). Smoothing with the Loess method was applied on the results of triplicates. **B:** Kinetics parameters obtained from CO₂ loss. MaxCO₂ = maximum CO₂ produced (in g/L); tF = fermentation time (time to reach CO₂ production rate < 0.02 g/L/h), Vmax = maximum rate of CO₂ production, and Latency = time necessary for total CO₂ production to 5 g/L. ANOVA results are indicated by the p-value. Statistical groups determined with post-hoc Tukey tests are indicated with lowercase letters. C4: Consortium, Hu: Hanseniaspora uvarum, Lt: Lachancea thermotolerans, Mp: Metschnikowia pulcherrima, Sb: Starmerella bacillaris, Sc: Saccharomyces cerevisiae, Td: Torulaspora delbrueckii. _____ 143

Figure 4: Kinetics of consumption and production of central carbon metabolites monocultures and consortium. C4: Consortium, Hu: Hanseniaspora uvarum, Lt: Lachancea thermotolerans, Mp: Metschnikowia pulcherrima, Sb: Starmerella bacillaris, Sc: Saccharomyces cerevisiae, Td: Torulaspora delbrueckii. _____ 145

Figure 5: Final yield (in g of metabolite/g of consumed sugar) for metabolites of the different species and consortium C4 (in black). For pyruvic acid, both the end yield (endYpyruvic), and yield at the maximum concentration (max Ypyruvic) are displayed. ANOVA results are indicated by the p-value. Statistical groups determined with post-hoc Tukey tests are indicated with lowercase letters. C4: Consortium, Hu: Hanseniaspora uvarum, Lt: Lachancea thermotolerans, Mp: Metschnikowia pulcherrima, Sb: Starmerella bacillaris, Sc: Saccharomyces cerevisiae, Td: Torulaspora delbrueckii. _____ 146

Figure 6: Individual growth of the different species in consortium C4. The grey solid line corresponds to the cell concentration $\log_{10}(\text{cells/mL})$, the grey dotted line to the percent of live cell. Solid color lines describe the percent of the different species. Initial abundances were: 10 % S. cerevisiae (Sc), 35% H. uvarum (Hu), 25% M. pulcherrima (Mp), 20% S. bacillaris (Sb), 5% L. thermotolerans (Lt), and 5% T. delbrueckii (Td). _____ 148

Supplementary Figure 1: Fluorescence of the different transformants used in this study. _____ 156

Supplementary Figure 2: Comparison of growth of wild type strains and transformants in MS425. auc = area under the curve (global parameter), k = maximum population, r = growth rate. Numeric values indicate p-value of a t-test between transformants and WT. Hu: Hanseniaspora uvarum, Lt: Lachancea thermotolerans, Sb: Starmerella bacillaris, Sc: Saccharomyces cerevisiae, Td: Torulaspora delbrueckii. _____ 157

Supplementary Figure 3: Population growth in monocultures fermentation. _____ 157

Chapitre 4

Figure 1: CO₂ production kinetics for both sugar conditions (S200 and S280). Dashed lines indicate the theoretical maximum CO₂ production according to the initial sugar concentration, considering a yield of 0.47 g CO₂/g sugar. _____ 173

Figure 2: Concentration of residual reducing sugars (A) and yields in CO₂ (B) after the fermentation stopped in the consortia and monocultures C01 to C13 for initial sugar concentrations of 200 and 280 g/L. C01 is a monoculture of S. cerevisiae. C02 to C11 initially contained 5% of S. cerevisiae. C12 initially contained 15% of S. cerevisiae and C13 did not contain S. cerevisiae. _____ 174

Figure 3: Percent of live cells along the fermentation. Vertical lines indicate the theoretical maximum CO₂ that can be produced from the initial sugar concentration. C01 is a monoculture of *S. cerevisiae*. C02 to C11 initially contained 5% of *S. cerevisiae*. C12 initially contained 15% of *S. cerevisiae* and C13 did not contain *S. cerevisiae*.

175

Figure 4: Population dynamics in consortia during fermentation with 200 and 280 g/L of sugars. C01 is a monoculture of *S. cerevisiae*. C02 to C11 initially contained 5% of *S. cerevisiae*. C12 initially contained 15% of *S. cerevisiae* and C13 did not contain *S. cerevisiae*. Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Td: *Torulaspora delbrueckii*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*.

178

Figure 5: Relative change between the S200 and S280 conditions in metabolite yield. Both sugar conditions were compared by T-test. Results are indicated on top. Gray bars: p-value > 0.05; *, **, ***: p-value inferior to 0.05, 0.01, 0.0001 respectively (in blue when the difference is positive, red when the difference is negative).

180

Figure 6: Metabolite yield changes in the different consortia (calculated by dividing the difference between measures for S280 and S200 by the measure for S200). Both sugar conditions were compared by T-test. Results are indicated on top. Gray bars: p-value > 0.05; *, **, ***: p-value inferior to 0.05, 0.01, 0.0001 respectively (in blue when delta is positive, red when delta is negative). Orange diamonds indicate the values observed in C01 (*Sc* monoculture). C02 to C11 initially contained 5% of *S. cerevisiae*. C12 initially contained 15% of *S. cerevisiae* and C13 did not contain *S. cerevisiae*.

182

Figure 7: Correlation matrix between initial abundance of the different NS species in consortia C02 to C11 (all inoculated with 5% of *S. cerevisiae*) and fermentation performance (Y: yield in metabolites and CO₂, Vmax: maximum CO₂ production rate, sugar_final: residual sugar concentration). Only significant correlations (p-value < 0.05) are displayed. A: With 200 g/L of sugar. B: With 280 g/L of sugar.

184

Figure 11 : Description de l'échelle utilisée pour caractériser la floculation

202

Supplementary Figure 1: Evolution of viable cell count of *S. cerevisiae* (*Sc*) and non-*Saccharomyces* (*NS*) across fermentation progress measured by CO₂ release.

186

Supplementary Figure 2A: Evolution of abundance of *H. uvarum* (*Hu*) across fermentation.

18686

Supplementary Figure 2B: Evolution of abundance of *L. thermotolerans* (*Lt*) across fermentation.

18687

Supplementary Figure 2C: Evolution of abundance of *S. bacillaris* (*Sb*) across fermentation.

18687

Supplementary Figure 2D: Evolution of abundance of *T. delbrueckii* (*Td*) across fermentation.

18688

Supplementary Figure 3: Matrix of the difference in abundance at 45h of live cells and species between the S200 and S280 conditions. Labels indicate the % difference between S200 and S280 ($\Delta = S280 - S200$). Gray keys indicate non-significant differences (as measured by a T-test on the abundance after transformation with the arcsin function). Colored keys indicate a significant difference between S200 and S280.

18888

Supplementary Figure 4: Correlation between initial diversity, as measured by Shannon index, and fermentation parameters.

18989

Discussion générale

Figure 12 : Schéma récapitulant la composition du consortium, les propriétés remarquables de chaque espèce en mono-culture, ainsi que les informations sur leur dynamique dans le consortium. Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Td: *Torulaspora delbrueckii*.

214

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des caractéristiques les plus saillantes de sept espèces de levures incluses dans ce travail. Les images microscopie ont été réalisées avec un microscope Imager.A2 équipé d'une caméra AxioCam MRm (Zeiss, Göttingen, Allemagne). *D'après Roudil et al., 2020 _____ 47

Chapitre 1

Supplementary Table 1: Plasmid list _____ 85

Supplementary Table 2: Primer list for plasmid construction _____ 86

Supplementary Table 3: Primers list for cassette amplification _____ 87

Supplementary Table 4: Primer list and PCR conditions for checking the integration at the locus _____ 88

Chapitre 2

Table 1: List of yeast strains used in this study _____ 95

Table 2: Strain combination of the nine studied random consortia of seven yeast species. For the different species, inoculation was done using different initial relative abundance chosen to resemble natural grape must. _____ 96

Table 3: Results from the nested ANOVA performed yields in metabolites production. The species effect was considered as a fixed effect (p-value Species), while the strain effect was considered as a random effect (p-Value Strain) _____ 106

Supplementary Table 1: Residual sugars and metabolite concentrations (g/L) at the end of fermentation in mono-cultures of the 19 studied strains. _____ 120

Supplementary Table 2: Concentrations (in g/L) of metabolites and residual sugars at the end of fermentation, and yield in ethanol, glycerol, acetic acid and lactic acid (with Y prefix, in g of metabolite/g of consumed sugar). _____ 121

Tableau 2 : Résultats du calcul de la distance euclidienne entre chaque consortium et la moyenne de tous les consortia sur les résultats de l'ensemble des paramètres considérés dans cette étude. _____ 127

Chapitre 3

Table 1: List of yeast strains used in this study. _____ 133

Table 2: Description of the set of channels (with dichroic filters details) used for the detection of the different populations considered in this study. Voltages were set using fluorescent and wild type cells to ensure a proper signal of both. The fluorescence phenotype of each strain is indicated with + (fluorescent) and – (non-fluorescent) on the corresponding channel. _____ 138

Supplementary Table 1: List of plasmids _____ 150

Supplementary Table 2: List of primers used for the construction of plasmid by Gibson Assembly. Plasmid name indicates the constructed plasmid. **Bold nucleotides: sequence homologous to the template DNA.** _____ 151

Supplementary Table 3: Description of primers and PCR cycles used for the amplification of cassettes. UPPERCASE: Sequence homologous to integration locus, **bold nucleotides: Sequence homologous to plasmid.** Enzyme: KAPA HiFi HotStart Enzyme (Roche KK2502) or Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) _____ 152

Supplementary Table 4: List of primers and PCR cycles details for the verification of the correct integration of cassettes at the locus. * Polymerase used for all amplifications: Taq Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Ref ep0402). UPPERCASE: primers annealing outside of the integrated cassette, at the target locus, lowercase: primer annealing in the cassette. _____ 153

Supplementary Table 5: Details of the concentrations (A) and yields (B) of metabolites, as well as CO₂ kinetics parameters (C) at the end of fermentations of mono-cultures and consortium. _____ 155

Supplementary Table 6: Cell concentration (in log₁₀) of the different species during fermentation of the consortium C4. _____ 156

Chapitre 4

Table 1: Composition (in %) and diversity index of the different consortia tested in this study. Sc = *S. cerevisiae*, Hu = *H. uvarum*, Sb = *S. bacillaris*, Lt = *L. thermotolerans*, Td = *T. delbrueckii*. _____ 170

Table 2: Description of the set of channels (with description of filters) used for the detection of the different populations considered in this study. _____ 171

Supplementary Table 1: Fermentation kinetics parameters. Different letters indicate statistical differences obtained from TUKEY test between consortia, within a sugar condition. _____ 189

Supplementary Table 2A: Evolution of the average relative abundance of the different populations in consortia C01 to C13 at 200 g/L of reducing sugar. _____ 190

Supplementary Table 2B: Evolution of the average relative abundance of the different populations in consortia C01 to C13 at 280 g/L of reducing sugar. _____ 190

Supplementary Table 3A: Average cell concentration (in log) at S200 _____ 193

Supplementary Table 3B: Average cell concentration (in log) at S280 _____ 193

Supplementary Table 4A: Concentration (in g/L) of different MCC metabolites at the end of fermentation. Different letters indicate statistical differences obtained from TUKEY test between consortia, within a sugar condition. _____ 196

Supplementary Table 4B: Yields at the end of fermentation (in g of metabolites / g of consumed sugar) for different MCC metabolites. Different letters indicate statistical differences obtained from TUKEY test between consortia, within a sugar condition. _____ 196

Tableau 3 : Résultats des mesures de floculation dans les différents consortia à 200 et 280 g/L de sucres initial. _____ 203

Liste des annexes

- Annexe 1** : Composition du moût synthétique (SGM425) à 200 g/L de sucres. Le moût synthétique est stocké à 20°C. _____ 216
- Annexe 2** : Composition de la solution stock d'acides aminés utilisée dans la préparation du moût synthétique. Cette solution est stockée à -20°C. _____ 217
- Annexe 3** : Composition de la solution mère d'oligo-éléments utilisée dans la préparation du moût synthétique. La solution est stockée à 4°C après filtration (0.22 µm). _____ 217
- Annexe 4** : Composition de la solution de vitamine utilisée dans la préparation du moût synthétique. La solution de biotine et la solution mère de vitamines sont stockées à -20°C. _____ 218
- Annexe 5** : Compositions de la solution mère et de la solution de travail de phytostérols utilisée dans la préparation du moût synthétique. Les deux solutions sont stockées à 4°C à l'abri de la lumière. La solution mère est chauffée à 60°C avant dilution. _____ 218
- Annexe 6** : Composition de la solution mère de fer utilisée dans la préparation du moût synthétique. _____ 218

Liste des communications

Publication

Pourcelot E., Conacher C., Marlin T., Bauer F., Galeote V. et Nidelet T., 2023 « **Comparing the hierarchy of inter-and intraspecies interactions with population dynamics of wine yeast cocultures** », FEMS Yeast Research : foad039.

Présentations orales

Pourcelot E., Conacher C. G., Marlin T., Bauer F. F., Galeote V., Nidelet T., 2023. **Evaluating the strain effect in a model consortium of the wine yeast community.** PYFF8 (Physiology of Yeasts and Filamentous Fungi) – Cork, Irlande

Pourcelot E., Conacher C. G., Marlin T., Bauer F. F., Galeote V., Nidelet T., 2022. **Interactions entre levures œnologiques : association d'effets entre souches et espèces.** Microbes 2022 – SFM (Société Française de microbiologie) – Montpellier, France

Posters

Pourcelot E., Conacher C. G., Marlin T., Bauer F. F., Galeote V., Nidelet T., 2022. **Unravelling specificities in wine yeast interactions.** Journée de la Filière APAB (Ecole Doctorale) – Montpellier, France et présenté par Becerra C. au Congrès ISSY (International Specialised Symposium on Yeasts) – Vancouver, Canada

Pourcelot E., Galeote V., Nidelet T., 2021. **Development of a model consortium of wine yeasts to explore the impact of diversity on wine fermentation.** LMO (Levures, modèles et outils) - Strasbourg, France

Pourcelot E., Bloem A., Galeote V., Nidelet T., 2021. **Développement d'un consortium modèle du vin pour explorer l'impact de la diversité sur la fermentation.** Colloque de l'AFEM (Association Francophone d'Ecologie Microbienne) – En ligne

Interventions grand public

Apprentis Chercheurs, 2023. Projet **Identification des levures de notre environnement** avec Angèle Thiriet. Encadrement de 2 élèves de 1^{ère} et un élève de 3^{ème} pendant 10 demi-journées au laboratoire.

Fête de la Science, 2022. Stand UMR SPO : Ateliers autour de la fermentation, d'agar art et de reconnaissance d'arômes.

Apprentis Chercheurs, 2022. Projet **Transformation de levures pour une application en écologie microbienne** avec Thibault Nidelet et Diego Segond. Encadrement de 2 élèves de 1^{ère} pendant 10 demi-journées au laboratoire.

Liste des abréviations

ACP (PCA)	Analyse en composante principale
ADN (DNA)	Acide DesoxyriboNucléique
ANOVA	Analyse de variance
ARISA	<i>Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis</i>
ARN (RNA)	Acide RiboNucléique
CO ₂	Dioxyde de carbone
DO (OD)	Densité Optique (DO ₆₀₀ : Densité optique à 600 nm)
FP	Protéine Fluorescente
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
H ₂ S	Sulfure d'hydrogène
Hu	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
IP	Iodure de Propidium
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LSA	Levures Sèches Actives
Lt	<i>Lachancea thermotolerans</i>
MCC	Métabolisme Carboné Central
Mp	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
MS (SGM)	Mout synthétique (MS425 200G/F : mout synthétique avec 425 mg/L d'azote assimilable et 200 g/L de sucres en mélange équimolaire glucose/fructose)
mTagBFP2	<i>Blue Fluorescent Protein</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
NS	Non- <i>Saccharomyces</i>
pb, kb	paires de bases, kilobases
PCR	« Polymerase Chain Reaction », réaction de polymérase en chaine
Pku	<i>Pichia kudriavzevii</i>
Qsp	quantité suffisante pour
RNP	<i>RiboNucleoProtein</i>
Sb	<i>Starmerella bacillaris</i>
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SO ₂	Dioxyde de soufre (sulfite)
Td	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
UFC (FCU)	Unité Formant Colonie
WT	<i>Wild Type</i>
YAN	« Yeast Assimilable Nitrogen », Azote Assimilable
YPD	Yeast Peptone Dextrose

Introduction générale

La diversité microbienne est mise à profit depuis déjà plusieurs millénaires pour la production de différents produits fermentés comme le fromage, les légumes fermentés, le pain ou encore le vin. Le vin est une boisson résultant de l'action conjointe de diverses levures, en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, et de bactéries qui vont transformer le moût de raisin en une boisson alcoolisée aux arômes variés. Le processus était au départ peu maîtrisé et était issu du développement spontané des micro-organismes. En 1863, les travaux de Pasteur ont mis en évidence le rôle des levures comme agents microbiologiques responsables de la transformation des sucres présents dans le moût en éthanol et dioxyde de carbone, puis Müller-Thurgau a démontré la possibilité d'utiliser des cultures pures de levure. La fermentation fut alors réalisée après inoculation de souches isolées et sélectionnées pour leurs propriétés fermentaires qui étaient ajoutées au moût en grande quantité. L'utilisation de souches isolées de *S. cerevisiae* a aussi permis l'optimisation du procédé grâce à leur sélection mais aussi en déterminant un certain nombre de paramètres optimaux, tels que la quantité d'azote assimilable ou la température, permettant, d'une part, de terminer la fermentation (sucres résiduels < 2 g/L) et, d'autre part, de développer le potentiel aromatique. Cependant, cette méthode est actuellement critiquée car elle donne lieu à une standardisation des vins. Par ailleurs, les changements globaux soumettent le secteur vinicole à des défis d'envergure, comme les changements de composition de la baie liés au découplage des différentes maturités du raisin, ainsi que de nouvelles attentes des consommateurs qui recherchent des produits plus sains et utilisant moins d'intrants. Ainsi, des stratégies de fermentation mixte, associant une ou plusieurs souches de levures dites "non-*Saccharomyces*" avec une souche de *S. cerevisiae*, se sont développées pour répondre à ces différents enjeux. En effet, des espèces non-*Saccharomyces*, notamment *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*, *Starmerella bacillaris* ou *Torulaspota delbrueckii*, sont étudiées pour leur potentiel de réduction du pH, de réduction du taux d'éthanol, de développement d'arômes ou encore de bioprotection pour limiter l'utilisation de sulfites. Ces espèces sont naturellement présentes sur la baie et dans le moût, au côté d'autres espèces comme *Hanseniaspora uvarum*, *Aureobasidium pullulans*, des espèces des genres *Pichia* ou *Rhodotorula*, constituant une communauté microbienne diversifiée. De nombreux facteurs, environnementaux et anthropiques, vont influencer la présence de chaque espèce et la dynamique se mettant en place en début de fermentation. En effet, les levures non-*Saccharomyces* présentes en début de fermentation vont croître puis rapidement laisser place

à *S. cerevisiae* qui est généralement non détectée dans le moût initial. Cette dynamique est modulée par la température, la disponibilité de différents nutriments et en oxygène, ainsi que par les interactions mises en place entre les différentes espèces. Bien que les récentes recherches explorent les mécanismes impliqués lors de fermentations mixtes et les différents leviers permettant d'optimiser ces fermentations, il reste encore difficile d'appréhender la dynamique microbienne en communauté complexe lors de la fermentation œnologique. Pour explorer les moteurs de cette dynamique microbienne, les communautés modèle simplifiée, aussi appelée « consortium modèle », représentent une formidable opportunité. En effet, des communautés microbiennes modèles ont déjà montré leur potentiel pour élucider les interactions entre bactéries d'écosystèmes naturels (sol, tractus gastro-intestinal), mais aussi d'autres produits fermentés que le vin.

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé des marquages différentiels des espèces avec des protéines fluorescentes pour permettre la construction d'une communauté modèle incluant *in fine* 6 espèces (*S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *M. pulcherrima*, *S. bacillaris*, *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans*). Lors de cette étude, nous avons également cherché à explorer l'effet de diversité, à la fois en terme de souche et en terme d'équitabilité de la communauté microbienne, sur le processus de fermentation conduit par un consortium plurispécifique. Cette communauté pourrait servir à approfondir les connaissances sur les leviers des interactions et de la dynamique microbienne lors de la fermentation, et être appliqué pour le développement de *starters* multiples plus performants.

Introduction

bibliographique

I. Principe et enjeux actuels en œnologie

Le vin est une boisson fermentée issue d'un héritage culturel de plusieurs milliers d'années déjà. Les premières traces de vinification connues à l'heure actuelle datent du néolithique (environ 5900-5500 av. J.-C.) dans des jarres retrouvées en Géorgie (McGovern *et al.* 2017). En Egypte et pendant l'Antiquité, le vin fait partie de la vie quotidienne et était utilisé à la fois lors de cérémonies religieuses et comme boisson accompagnant les repas (Rosso 2012). L'expansion de la culture viticole a suivi l'expansion de l'Empire Romain et s'est ainsi répandue à l'ensemble du bassin méditerranéen (Engs 1995). Les vignes seront ensuite exportées de l'Europe vers l'Amérique Latine, les Etats-Unis, l'Australie et l'Afrique du Sud qui sont aujourd'hui parmi les premières régions productrices ou consommatrices de vin (Pretorius 2000 ; OIV 2022).

Aujourd'hui, malgré une tendance générale de réduction de la consommation en Europe, le vin reste un élément culturel significatif, comme le montre l'inscription des Climats de Bourgogne au patrimoine mondial de l'UNESCO en 2015 ou l'ouverture de la Cité du Vin à Bordeaux en 2016. Le développement de l'œnotourisme est d'ailleurs un marqueur de la mise en valeur du patrimoine culturel lié à l'œnologie (Lignon-Darmaillac 2014).

Cependant, le monde vitivinicole est actuellement confronté aux défis résultant des changements climatiques et sociétaux qui modifient profondément les manières de vivre et consommer.

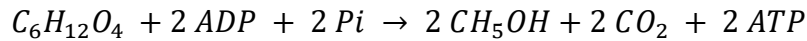
1. Principe de la fermentation

La fermentation œnologique consiste en la conversion du moût de raisin en vin permettant une conservation plus longue et le développement de nouvelles propriétés organoleptiques. Ce procédé comporte plusieurs étapes, qui peuvent varier selon le type de vin produit. Le schéma général de vinification nécessite l'obtention d'un moût par foulage ou pressurage (élimination des pellicules et pépins) des raisins avant le démarrage de la fermentation alcoolique réalisée par les levures.

Typiquement, le moût de raisin contient une teneur élevée en sucre entre 150 et 240 g/L (mélange équimolaire de glucose et de fructose), un pH bas entre 2,8 et 3,5 (Ribéreau-Gayon *et al.* 2020). En plus des sucres, la présence d'azote assimilable autour de 40 à 220 mg/L (sous forme d'ammonium et d'acides aminés, majoritairement l'arginine, la thréonine et

l'acide glutamique, ainsi que de peptides), de vitamines et d'oligoéléments, permettent la nutrition des micro-organismes impliqués dans la fermentation (Henschke et Jiranek 1993 ; Kemsawasd *et al.* 2015 ; Marsit et Dequin 2015).

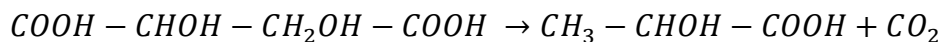
La conversion des sucres en éthanol et CO₂ pendant la fermentation suit l'équation :



Cette fermentation peut être spontanée si elle est réalisée par la population microbienne indigène présente sur les baies et dans le chai, sans ajouts de ferments, ou initiée par addition d'un pied-de-cuve ou de levures commerciales appelées *starters* et qui sont principalement des levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

La fermentation alcoolique s'accompagne de la libération de métabolites secondaires tels que le glycérol ou l'acétate qui peuvent impacter positivement ou négativement les propriétés organoleptiques du vin. De plus, les levures sont également responsables de la production d'arômes "fermentaires" comme les esters et les alcools supérieurs, directement issus de leur métabolisme. Cette production est dépendante de la composition initiale du moût, notamment de la disponibilité en azote (Lambrechts et Pretorius 2000 ; Mouret *et al.* 2014). Les levures vont aussi permettre la libération des certains arômes "variétaux", présents dans le moût sous forme de précurseurs.

A la fin de la fermentation, la population levurienne décroît, en raison de la diminution des nutriments disponibles et à l'augmentation de la concentration en éthanol. La fermentation alcoolique est suivie d'une fermentation malolactique lors de vinification en rouge, et plus rarement pour certaines vinifications en blancs lorsque les baies contiennent d'importantes concentrations d'acide malique. La fermentation malolactique, réalisée le plus souvent par la bactérie lactique *Lactococcus oeni*, correspond à la décarboxylation du diacide acide malique en monoacide acide lactique, permettant une réduction de l'acidité (Lonvaud-Funel 1995).



Cette étape est aussi accompagnée de la production de diacétyl et d'acétoïne par les bactéries, ce qui peut participer à donner des caractéristiques beurrées au vin. Cette caractéristique variant de manière importante selon la souche bactérienne et le type de vin (Bauer et Dicks 2004, Bartowsky et Henschke 2004).

2. S'adapter aux changements climatiques

Aujourd'hui, les changements climatiques sont observables globalement et affectent tous les secteurs d'activité, dont la vitiviniculture. Ainsi, dans de nombreuses régions viticoles, une augmentation progressive des températures est observée (Duchène et Schneider 2005 ; Lereboullet et al. 2013 ; Gambetta et Kurtural 2021). De plus, ceci est accompagné d'une augmentation du risque de sécheresse (Lereboullet et al. 2013). Les changements climatiques vont probablement conduire à une réorganisation de la géographie des zones viticoles (Mozell et Thach 2014). Par exemple, l'augmentation des températures dans les régions Méditerranéennes rendront le climat inadapté à certaines variétés actuellement cultivées (Fraga et al. 2016 ; Santillán et al. 2019). Tandis que des régions plus au nord seront alors plus adaptées pour la viticulture (Jones et al. 2005 ; Fraga et al. 2016). Aujourd'hui, les acteurs du secteur observent les conséquences du réchauffement climatique par l'avancement des vendanges (Duchène et Schneider 2005 ; Mira De Orduña 2010). Cet avancement est lié à une accélération de la maturation des baies et s'accompagne d'un décalage entre la maturation physiologique (teneur optimale en sucres) et la maturation phénolique (Figure 1). En conséquence, dans certaines régions, les raisins sont vendangés après la maturité technologique, impliquant une concentration en sucre plus importante et une augmentation de l'éthanol potentiel allant jusqu'à 2 % (Keller 2010 ; Van Leeuwen et Darriet 2016 ; Navrátilová *et al.* 2021). Au contraire, la teneur en composés phénoliques (essentiels à la couleur des vins) ainsi que l'acidité totale, en particulier l'acide malique, tendent à diminuer pouvant altérer les propriétés organoleptiques du produit (Keller 2010 ; Mira De Orduña 2010 ; Lereboullet *et al.* 2013).

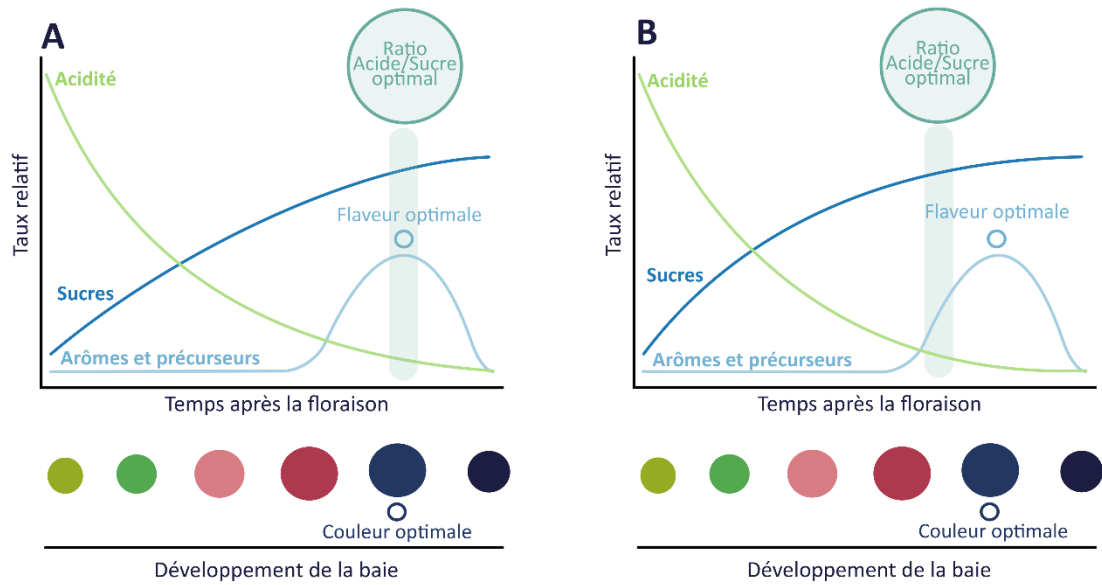


Figure 1 : Comparaison schématique de la cinétique de maturation des baies de raisin en conditions idéales (A) et dans des conditions de températures plus élevées (adapté de Ubeda et al., 2020).

Les changements climatiques amènent donc à une réflexion générale sur l'adaptation des pratiques pour maintenir la production vinicole de qualité. Par exemple, cela pourrait amener à changer les cépages utilisés pour sélectionner ceux qui sont les mieux adaptés à la chaleur ou à la sécheresse (Van Leeuwen et Darriet 2016). En parallèle, des études de croisement de cépages cherchent à obtenir des cépages plus résistants aux maladies (mildiou, oïdium) pour limiter l'utilisation de phytosanitaires et donc l'impact environnemental de la viticulture (Mozell et Thach 2014 ; Töpfer et Trapp 2022). Cela s'accompagne aussi d'un changement des pratiques en chai, en adaptant les itinéraires de vinification pour limiter l'éthanol ou corriger l'acidité; notamment via l'utilisation de levures sélectionnées ou obtenues par évolution dirigée, ou par désalcolisation partielle du vin par nano-filtration ou osmose inverse, généralement couplé à une étape de distillation (El Rayess et Mietton-Peuchot 2016 ; Tilloy et al. 2015 ; Dequin et al. 2017).

3. Répondre aux nouvelles attentes des consommateurs

En réponse à ces changements climatiques, les consommateurs sont désormais à la recherche de produits plus sains, avec moins d'intrants chimiques et plus respectueux de l'environnement. Cela s'accompagne également d'une volonté de retourner à des pratiques plus traditionnelles.

En France, les réglementations concernant le « bio » sont régies à l'échelle européenne et par l'INAO (Institut National de l'Origine et de la Qualité) à l'échelle nationale. Un vin « bio » doit être produit à partir d'ingrédients « bio », c'est-à-dire à partir de raisins « bio » cultivés sans applications de pesticides de synthèse et d'herbicides au vignoble, des Levures Sèches Actives (LSA) bio si disponibles, etc. Cela implique également une limitation plus stricte sur l'utilisation du SO₂, et des restrictions sur certaines pratiques œnologiques. D'autres labels peuvent être rencontrés sur les produits, notamment concernant les « vins méthode nature », qui représente 2% de la production viticole (Caillet *et al.* 2020). Les contraintes liées à ces labels sont plus restrictives que le « bio », et sont déterminées par les associations conférant les différents labels, et non à l'échelle nationale ni européenne. Une autre pratique en développement est le vin « biodynamique », produit à partir de vignes gérées selon les principes de la biodynamie définis par R. Steiner en 1924 (Castellini *et al.* 2017). L'un des points communs du cahier des charges de la biodynamie et des « vins méthode nature » est que la fermentation alcoolique doit être réalisée de manière spontanée, sans ajout de levures exogènes. D'ailleurs, cette pratique est aussi majoritairement utilisée par les producteurs en bio (entre 70 et 80% ; ITAB 2015). La fermentation alcoolique est alors conduite par le microbiote indigène présent sur les baies ou dans le chai, directement ou après ensemencement suite à une prolifération préalable des levures grâce à la préparation d'un pied-de-cuve. Ces fermentations sont généralement associées à des risques plus élevés de fermentations languissantes si elles sont mal gérées, et demandent une attention particulière tout le long du processus de fermentation ou de la préparation du pied-de-cuve (Pretorius 2000; Mas et Portillo 2022) En revanche, peu de données sont disponibles sur l'utilisation de ces pratiques pour les vinifications conventionnelles.

S'adaptant aux changements globaux (climatiques et sociétaux), la filière viti-vinicole montre une progression de la filière « bio ». En 2022, le « bio » représente 21% de la surface de vignoble français et 10% du volume de vin produit en France (Agence Bio). Des observations similaires sont faites en Europe et dans le monde (Fabbrizzi *et al.* 2021). Il a aussi été observé une augmentation de 2,2% des ventes de vins « bio » entre 2021 et 2022 en France montrant l'intérêt des consommateurs pour ces produits (Agence Bio). De nombreux consommateurs se disent ainsi prêts à payer un vin plus cher s'il est « bio » (Deneulin et Dupraz 2018), « naturel » (Galati *et al.* 2019) ou « sans sulfites » (D'Amico *et al.* 2016). Les vins avec un label « bio » ou « nature » sont généralement perçus comme plus sains (Galati *et al.* 2019 ; Deroover *et al.*

2021 ; Fabbrizzi *et al.* 2021). Toutefois, la confusion autour des différents labels existants, limitant la compréhension des valeurs associées au produit, peut constituer un frein à l'achat (D'Amico *et al.* 2016 ; Alonso González et Parga-Dans 2020). Il est à noter que la connaissance des différents labels et l'intérêt pour les vins « naturels » ou « sans sulfites » semblent corrélés à l'intérêt général pour le vin (Fabbrizzi *et al.* 2021). De plus, les facteurs principaux déterminant l'achat d'un vin restent la qualité et le prix, et un label « bio » n'augmente pas la probabilité d'achat (Costanigro *et al.* 2014; Galati *et al.* 2019). Il est donc primordial d'adapter les pratiques vitivinicoles tout en assurant une qualité du produit fini.

Ainsi, l'ensemble de ces adaptations (*starters* multi-espèces, réduction des intrants, vins issus de fermentations indigènes) donne plus d'importance au microbiote indigène ainsi qu'aux interactions microbiennes et incite à une meilleure compréhension de la dynamique des levures lors de la fermentation.

II. Diversité des micro-organismes en œnologie

1. La fermentation, un processus dynamique

Divers micro-organismes (bactéries, levures et champignons filamenteux) sont présents lors de la vinification, montrant une succession dynamique (Figure 2). Généralement, il y a entre 10^3 à 10^6 UFC (Unité Formant Colonie) de levures par gramme de baie, selon son état sanitaire, et cette population comprend jusqu'à une dizaine d'espèces (Fleet 2003 ; Barata *et al.* 2012).

Une récente méta-analyse de 231 publications, décrivant les espèces de levures isolées en milieu œnologique, a révélé l'identification de plus de 250 espèces de levures, dont 170 dans plusieurs études (Drumonde-Neves *et al.* 2021). Les espèces les plus fréquemment isolées depuis la baie sont des espèces dites "non-*Saccharomyces*", terme communément utilisé en œnologie pour désigner les espèces n'appartenant pas au genre *Saccharomyces* (Figure 3). Les espèces en proportion importante sont *Hanseniaspora uvarum* et la pseudo-levure *Aureobasidium pullulans* (Fleet 2003 ; Drumonde-Neves *et al.* 2021). D'autres espèces sont souvent isolées sur les baies ou au vignoble, telles que des espèces des genres *Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Metschnikowia* ainsi que *Starmerella bacillaris* et d'autres espèces du genre *Hanseniaspora* (Jolly *et al.* 2006 ; Barata *et*

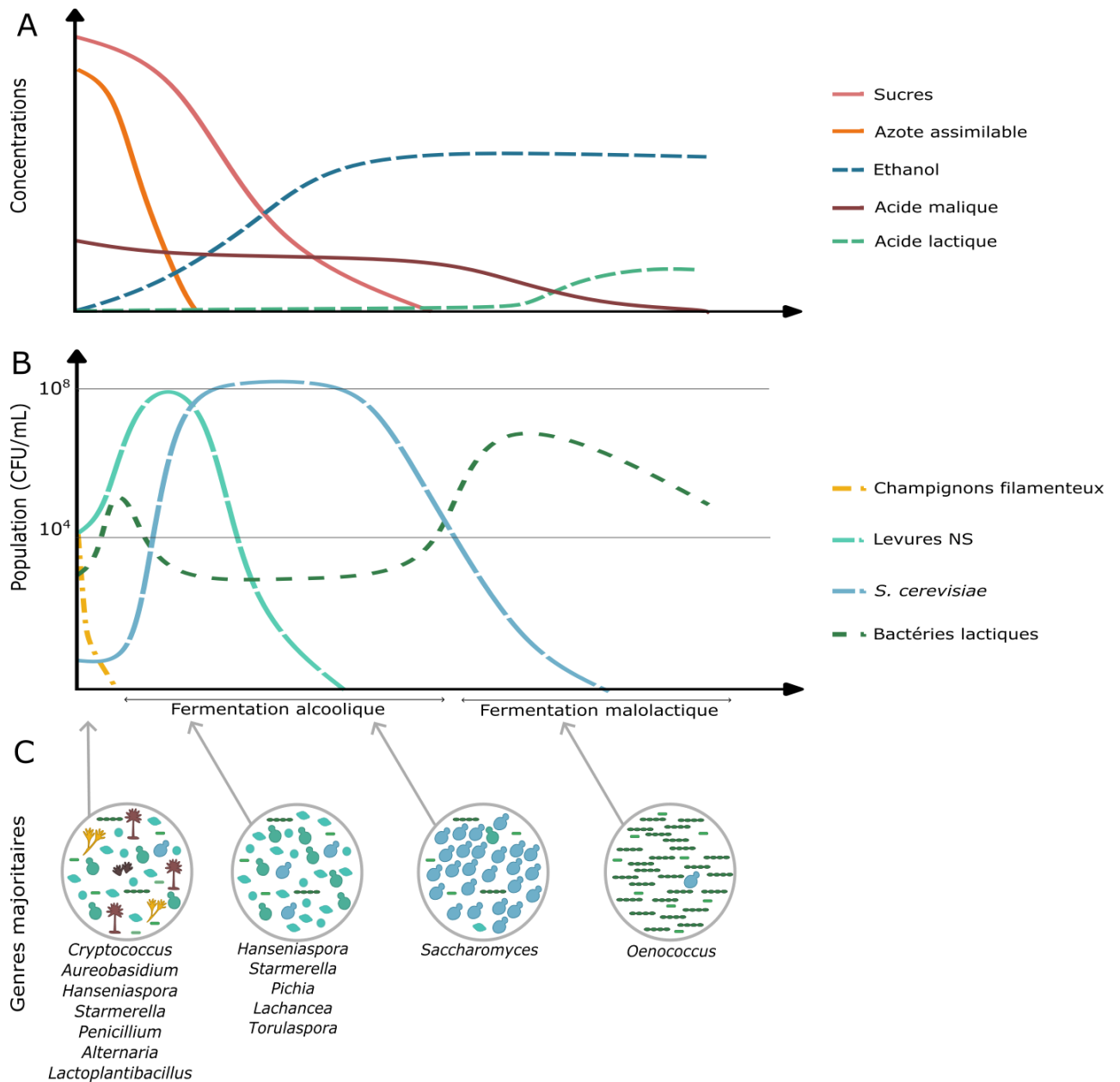


Figure 2 : Schéma simplifié de la dynamique microbienne et de l'évolution métabolique lors de la vinification. **A** : Cinétique de consommation des sucres, sources d'azote assimilable et d'acide malique, et production d'éthanol et acide lactique. **B** : Evolution schématique des différentes populations (levures, bactéries, champignons filamenteux) **C** : Description des principaux genres de micro-organismes isolées aux principales étapes de vinification : moût, début de fermentation alcoolique, milieu de fermentation alcoolique, fermentation malolactique (adapté de Conacher et al. 2019 ; Krieger-Weber et al. 2020).

al. 2012 ; Drumonde-Neves *et al.* 2021, Figure 2). En début de fermentation, certaines non-*Saccharomyces*, comme *H. uvarum*, *M. pulcherrima*, *S. bacillaris*; *Lachancea thermotolerans*, *Torulasporea delbrueckii* vont initialement proliférer et atteindre jusqu'à 10^8 UFC/mL (Fleet 2003 ; Combina *et al.* 2005 ; Jolly *et al.* 2006 ; Bagheri *et al.* 2016 ; Varela et Borneman 2017 ; Figure 2). Puis, *Saccharomyces cerevisiae* se multiplie rapidement et devient la levure majoritaire pendant la phase la plus active de la fermentation, alors qu'elle n'est généralement pas détectable sur la baie ou dans le moût (présence entre 10–100 UFC/g sur la baie; Fleet 2003). Pour sécuriser la fermentation, *S. cerevisiae* est souvent ajoutée au moût de raisin à de fortes concentrations sous forme de LSA commerciales sélectionnées pour leurs capacités fermentaires. En fin de fermentation alcoolique, elle constitue généralement la seule levure présente. Toutefois, des espèces non-*Saccharomyces*, notamment *S. bacillaris*, *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans*, *H. uvarum* peuvent également subsister en fin de fermentation, bien qu'en faible abondance (Jolly *et al.* 2006 ; Milanović *et al.* 2013 ; Tristezza *et al.* 2016). Certaines levures d'altération comme *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia membranifaciens* ou des *Zygosaccharomyces* spp. peuvent également être isolées après la fermentation alcoolique ou dans le vin (Jolly *et al.* 2006).

Après la fermentation alcoolique, la population bactérienne, en particulier les bactéries lactiques, envahit le milieu. On parle alors de la fermentation malolactique, liée à la décarboxylation de l'acide malique, qui constitue une étape essentielle pour la vinification en rouge. La fermentation malolactique est principalement réalisée par *O. oeni*, mais également *Lactiplantibacillus plantarum* (Lonvaud-Funel 1995 ; Bauer et Dicks 2004 ; Bartowsky *et al.* 2015). Toutefois, je ne développerai pas les aspects relatifs à cette fermentation qui n'a pas été étudiée durant le doctorat. De plus, les populations bactériennes montrent peu de changements durant la fermentation alcoolique (Barata *et al.* 2012 ; Portillo et Mas 2016 ; Morgan *et al.* 2019 ; Böhmer *et al.* 2020).

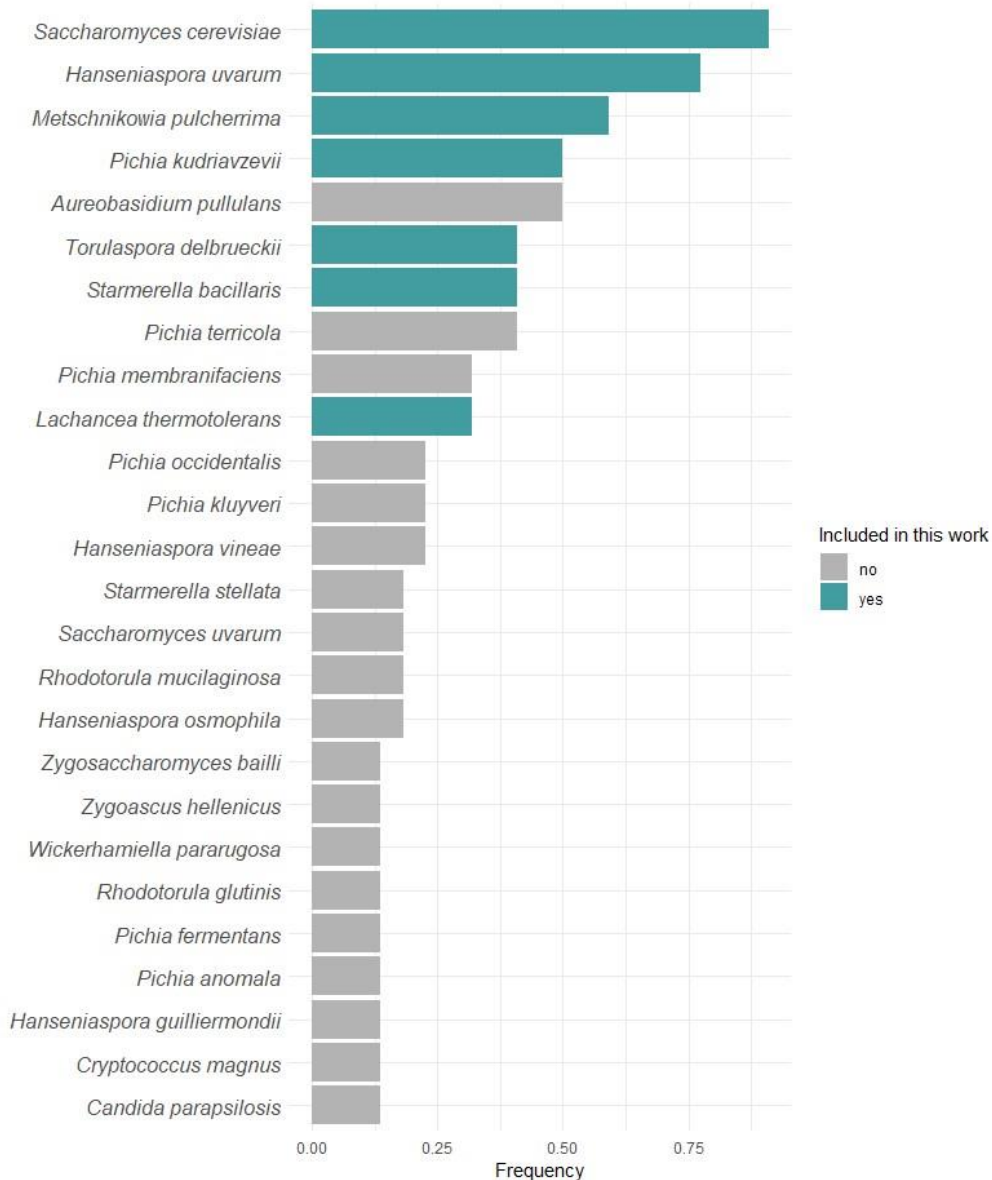


Figure 3 : Fréquence d’isolement de chaque espèce dans la littérature scientifique consacrée à l’étude de communautés naturelles en milieu œnologique (18 articles inclus). En bleu sont représentées les espèces étudiées dans ce travail de thèse.

2. Paramètres déterminant la diversité microbienne

a. Facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent influencer la diversité microbienne présente dans le vignoble et dans le moût (Figure 4). Ces paramètres étant interdépendants, cela rend complexe l’étude de leur importance relative. Les plus fortes variations observées sont généralement liées aux **variations interannuelles**. En effet, de nombreux articles

observent d'importantes différences de diversité, en termes de nombre d'espèces, mais aussi en termes de type d'espèce et de répartition entre années successives (Bagheri *et al.* 2016 ; Grangeteau *et al.* 2017). Ces différences de diversité peuvent se répercuter tout au long de la fermentation en impactant la dynamique microbienne, notamment de dominance de *S. cerevisiae* (González-Alonso *et al.* 2021 ; Varela *et al.* 2021). Des variations interannuelles ont également été décrites à l'échelle de la souche chez *S. cerevisiae* (Demuyter *et al.* 2004 ; González-Alonso *et al.* 2021). Ces variations entre années sont probablement dues en partie à des variations de composition du moût mais aussi à des conditions climatiques. En effet, le **climat** avec des paramètres tels que l'ensoleillement, les intempéries, et les températures peuvent moduler la diversité microbienne (Di Liu *et al.* 2019 ; Drumonde-Neves *et al.* 2021). Ainsi, certaines espèces, comme *Saccharomyces uvarum*, sont plutôt associées à des climats froids et sont parfois les levures responsables de la fermentation dans certaines régions (Ciani et Comitini 2019 ; Morgan *et al.* 2019). Concernant les intempéries, Drumonde-Neves *et al.* (2017) observent une plus faible diversité l'année associée à une plus forte pluviométrie. Au contraire, Jara *et al.* (2016) observent une population totale plus importante, et en particulier des *Metschnikowia* spp. et *Hanseniaspora* spp. dans les régions associées à une humidité relative plus importante ou de fortes précipitations. Ces différences pourraient être liées aux différences expérimentales (régions, cépages, échantillonnages, ...), ainsi qu'aux autres facteurs pouvant impacter la diversité microbienne. Ensuite, les différences de climats entre régions peuvent conduire à des variations de composition du microbiote de la baie et du moût suivant la **géographie** (Bokulich *et al.* 2014). Ainsi, plusieurs études observent des différences entre parcelles ou entre régions (Li *et al.* 2011 ; Morrison-Whittle et Goddard 2018 ; Di Liu *et al.* 2019), qui pourraient aussi être liées à la composition du **sol**. Par exemple, Drumonde-Neves *et al.* (2017) observent une diversité plus importante pour les parcelles cultivées sur un sol volcanique. Cette importance du sol est aussi mise en évidence dans l'étude de (Liu *et al.* 2020), qui montre que la composition du sol influence la composition du microbiote fongique du sol, certaines espèces pouvant ensuite se retrouver dans le moût (Morrison-Whittle et Goddard 2018).

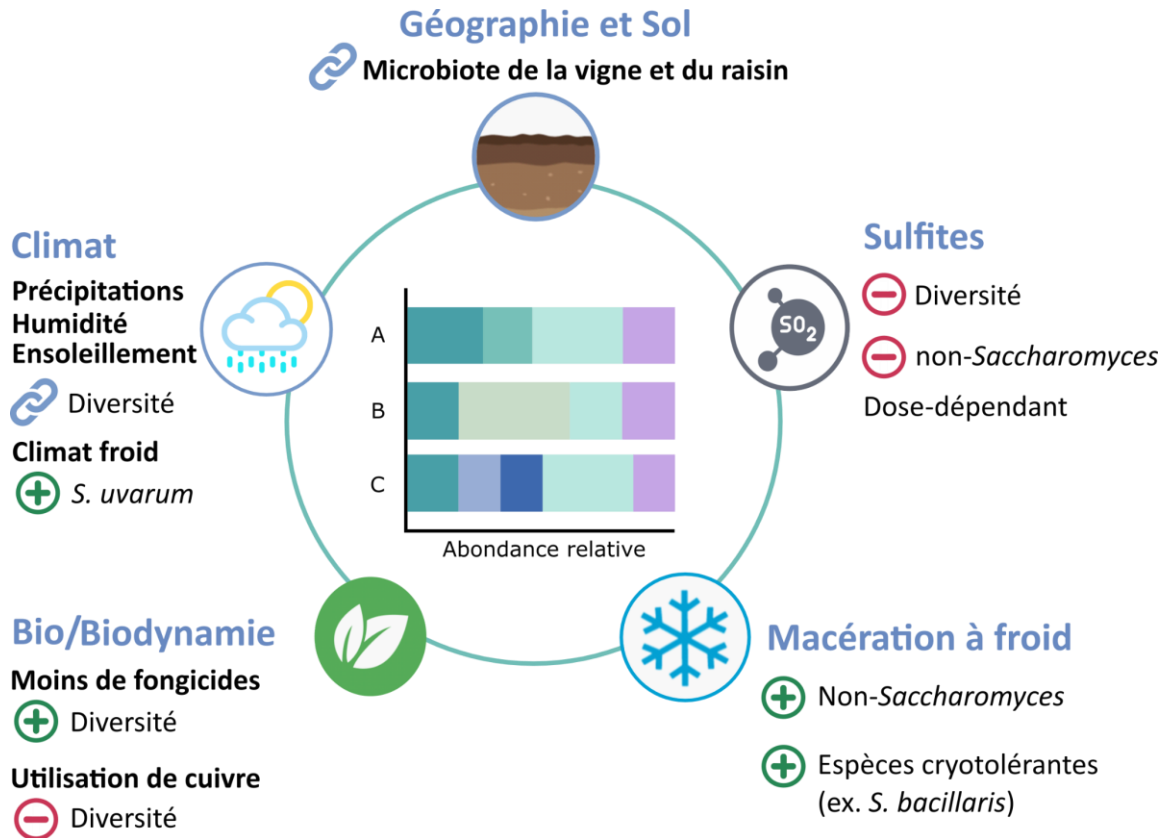


Figure 4 : Principaux facteurs environnementaux influençant la diversité microbienne dans le moût et représentation schématique des variations de richesse et d'uniformité des espèces dans 3 conditions hypothétiques différentes (A, B et C).

b. Pratiques vitivinicoles

La gestion du vignoble et du procédé de vinification peut aussi influencer les espèces présentes en milieu œnologique. Ainsi, la diversité microbienne de la baie est aussi fortement influencée par l'**état sanitaire** de la baie. En effet, la population totale de levures augmente au cours de la maturation du fruit, et la diversité tend à être plus importante quand les baies sont abîmées (Barata *et al.* 2012). De plus, la présence de champignons filamenteux (*Botrytis* sp, *Alternaria* sp., etc) serait associée à une plus grande richesse (nombre d'espèces) dans le moût (Nisiotou *et al.* 2007 ; Grangeteau *et al.* 2017). De nombreuses études cherchent également à évaluer l'impact de l'utilisation de pesticides et des **conduites en "bio" ou "biodynamie"**. Les différences entre traitements au vignoble sont soulignées par la présence d'espèces favorisées, voire uniques à certaines conditions (Bagheri *et al.* 2016 ; Grangeteau *et al.* 2017). Dans certains cas, les raisins et moûts issus de parcelles "bio" et "biodynamie" sont associés à une diversité plus importante, probablement liée à l'utilisation réduite de fongicides (Setati *et al.* 2012 ; Padilla *et al.* 2016). En revanche, Milanović *et al.* (2013) et Grangeteau *et*

al. (2017) observent une diversité réduite en “bio” comparée au conventionnel, qu’ils lient à un possible effet à large spectre du cuivre utilisé dans les vignes. Ces résultats contradictoires concernant l’utilisation de pesticides et les pratiques viticoles sont probablement liés à l’impact d’autres facteurs entrant en jeu (Ciani et Comitini 2019 : chap. 1).

Une fois au chai, du **SO₂** (dioxyde de soufre) est souvent ajouté au moût à des concentrations entre 20 et 100 mg/L, selon l’état sanitaire des baies et le moment d’ajout (Ribéreau-Gayon *et al.* 2020 ; Stockley *et al.* 2021). Cet agent possède 3 activités d’intérêt pour la stabilité du vin : il est antimicrobien (limite la croissance de nombreux micro-organismes), anti-oxydant (combine l’oxygène dissous) et anti-oxydasique (bloque l’activité des enzymes oxydantes). Étant un agent antimicrobien, le SO₂ impacte fortement les espèces de levures présentes dans le moût. En conséquence, le sulfitage tend à diminuer la diversité en début de fermentation, favorisant généralement *S. cerevisiae* qui y est assez résistante (Grangeteau *et al.* 2017 ; Morgan *et al.* 2019). L’action SO₂ sera d’autant plus importante que sa concentration est grande, et est modulée par le pH du milieu (Morgan *et al.* 2019 ; Cuijvers *et al.* 2020). Plusieurs paramètres de fermentation peuvent ensuite modifier la dynamique microbienne. En particulier, la **température** influe beaucoup puisque les basses températures favorisent les non-*Saccharomyces* et pourraient augmenter leur tolérance à l’éthanol (Ciani et Comitini 2019). Cela est notamment observé lors de la macération à froid des vins rouges, un procédé pour lequel les moûts sont maintenus à basse température (entre 4 et 8°C) pendant quelques jours, durant lequel le développement des non-*Saccharomyces* est prononcé, en particulier de *H. uvarum*, *H. osmophila* et *S. bacillaris* (Hierro *et al.* 2007 ; Zott *et al.* 2008 ; Maturano *et al.* 2015). Les non-*Saccharomyces* sont également favorisées par la présence d’**oxygène**, l’oxygénation leur permettant d’atteindre une biomasse plus importante et de se maintenir plus longtemps (Holm Hansen *et al.* 2001 ; Shekhawat *et al.* 2017 ; Varela *et al.* 2021).

Ainsi, un ensemble de facteurs viennent moduler les espèces présentes dans le moût. Certains facteurs, tels que l’ajout de SO₂, ont des conséquences sur les communautés levuriennes plutôt claires, tandis que des facteurs plus complexes, comme le climat et le type de viticulture, ont des effets moins compris (Figure 4).

3. Diversité génétique des principales espèces de levures en œnologie

Parmi l'ensemble des espèces isolées dans le moût ou pendant la fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Starmerella bacillaris*, *Pichia kudriavzevii*, *Torulaspota delbrueckii* et *Lachancea thermotolerans* sont parmi les plus fréquemment isolées (Figure 3). Dans ce paragraphe, je discuterai des différences caractéristiques des espèces de levures relatives à leurs données génétiques, en me limitant à ces sept espèces.

a. Spécificités génétiques

Bien que les données sur les génomes des non-*Saccharomyces* restent encore rares, on sait qu'elles montrent une certaine diversité génétique comparativement à *S. cerevisiae*. En effet, les différentes espèces peuvent présenter des tailles de génomes, contenu GC différents, etc (Dujon 2010). De plus, elles peuvent aussi présenter des niveaux de ploïdies différents. Les souches de *S. cerevisiae* isolées d'environnements œnologiques sont majoritairement diploïdes (Legras *et al.* 2007 ; Peter *et al.* 2018), et il semblerait que *M. pulcherrima* et *H. uvarum* soient également diploïdes (Masneuf-Pomarede *et al.* 2016 ; Langenberg *et al.* 2017 ; Venkatesh *et al.* 2018 ; Saubin *et al.* 2019). Au contraire, *T. delbrueckii* semble majoritairement haploïde (Silva *et al.* 2022). De même, *S. bacillaris* et *L. thermotolerans*, seraient haploïdes, mais cela reste à confirmer comme ces résultats se basent sur l'absence d'hétérozygotie de microsatellites (Masneuf-Pomarede *et al.* 2015 ; Hranilovic *et al.* 2017 ; Raymond Eder et Rosa 2020). Toutefois, la ploïdie peut aussi varier entre souches d'une même espèce.

Le génome de *S. cerevisiae* est caractérisé par la présence de nombreux gènes dupliqués issus d'un évènement de duplication complète du génome (WGD) (Wolfe et Shields 1997). Cet évènement est essentiel dans le développement des propriétés fermentaires de *S. cerevisiae* (Escalera-Fanjul *et al.* 2019). Par ailleurs, certains clades sont caractérisés par des particularités de code génétique, comme le clade dit des « CUG-Ser », dont font partie *M. pulcherrima* et *Candida albicans*. Pour les espèces de ce clade, le codon CUG est traduit en sérine et non en leucine (Santos *et al.* 1993 ; Mühlhausen et Kollmar 2014 ; Krassowski *et al.* 2018 ; Gordon *et al.* 2019). Un autre exemple de la diversité génétique représentée par les

espèces non-*Saccharomyces* est le clade des *Wickerhamiella/Starmerella* dont une partie du génome, notamment des gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies de fermentation comme les alcool déshydrogénases (*ADH*) ou des invertases (*SUC2*), semble avoir été perdus puis acquis par transfert horizontal depuis des bactéries (Gonçalves *et al.* 2018).

D'un point de vue technique, les différentes espèces de levures peuvent présenter des mécanismes de réparation de l'ADN différents. Ces différences sont importantes à considérer lors du développement d'outils moléculaires pour la manipulation génétique de telles espèces (Masneuf-Pomarede *et al.* 2016 ; Varela et Borneman 2017). A ce jour, deux voies majeures de réparation de l'ADN sont connues : la voie de réparation homologue (HR) - mécanisme conservatif utilisant des fragments homologues comme matrice - et la voie par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ; « Non Homologous End Joining ») - mécanisme non-conservatif réalisant une jonction simple (Klinner et Schäfer 2004 ; Navarrete et L. Martínez 2020). Bien que la plupart des gènes impliqués dans ces deux voies semblent conservés chez différentes espèces de levures, certains gènes essentiels ne sont pas présents chez toutes les espèces (Richard *et al.* 2005). Par ailleurs, *H. uvarum* fait partie de la lignée du genre *Hanseniaspora* dite "fast-evolving" et est caractérisée par un taux de mutation élevé dû à l'absence de certains gènes contrôlant le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Steenwyk *et al.* 2019). Cela souligne de possibles différences fonctionnelles. Il est connu que *S. cerevisiae* est très efficace pour faire la recombinaison homologue, même avec de courtes séquences homologues (≤ 40 bp; Baudin *et al.* 1993 ; Oldenburg 1997). Les outils développés pour la transformation de *S. cerevisiae* sont également applicables à certaines non-*Saccharomyces* comme *L. thermotolerans* (Varela et Borneman 2017). Cependant, de nombreuses autres non-*Saccharomyces* semblent plutôt favoriser la voie NHEJ, ce qui peut compliquer la mutagenèse dirigée (Varela et Borneman 2017 ; Cai *et al.* 2019). En effet, les espèces favorisant la voie NHEJ vont tendre à intégrer les fragments ADN aléatoirement dans leur génome. Pour contourner ce problème, plusieurs techniques ont été mises au point afin d'augmenter le taux de recombinaison homologue. Par exemple, l'utilisation de séquences homologues très longues (1kb), l'inhibition chimique des enzymes impliquées dans la voie NHEJ ou la mutation des gènes codant pour ces enzymes (Ku70/Ku80), ainsi que l'utilisation du système CRISPR-Cas9 (exprimé sur un plasmide épisomal, ou directement par électroporation du complexe

ribonucléique) ont montré une augmentation de la fréquence d'intégration au locus (Grahl *et al.* 2017 ; Löbs *et al.* 2017 ; Nambu-Nishida *et al.* 2017 ; Varela *et al.* 2020).

b. *Structure des populations des principales levures œnologiques*

Concernant les études de diversité au sein même des espèces, elles montrent des différences de structure de population, basées sur la diversité génétique intra-spécifique. Les méthodes d'identification moléculaire à l'échelle de la souche sont généralement la RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA), les microsatellites, le MLST (MultiLocus Sequence Typing) nécessitant le plus souvent des marqueurs spécifiques à chaque espèce ou genre (Pfliegler *et al.* 2014 ; Albertin *et al.* 2015 ; Hranilovic *et al.* 2017) ou le séquençage des génomes entier (Liti *et al.* 2009 ; Schacherer *et al.* 2009 ; Legras *et al.* 2018 ; Silva *et al.* 2022).

S. cerevisiae montre une forte structuration selon la niche écologique des souches (Legras *et al.* 2007 ; Schacherer *et al.* 2009). Cela souligne des événements de domestication, également mis en évidence par la présence de gènes dupliqués ou de régions spécifiques aux souches d'une niche (Legras *et al.* 2018 ; Peter *et al.* 2018). Au sein des souches d'environnement œnologique, il semble que la population de *S. cerevisiae* soit aussi structurée par l'origine géographique (Legras *et al.* 2007).

L. thermotolerans et *T. delbrueckii* montrent à la fois une forte structuration par niche écologique et par origine géographique pour les souches sauvages, mais pas pour les souches d'environnements anthropisés (Albertin *et al.* 2014 ; Hranilovic *et al.* 2017 ; Silva *et al.* 2022). Ceci indiquerait également un phénomène de domestication chez ces deux espèces. *Brettanomyces bruxellensis* montre une première structuration liée à la ploïdie des souches, mais également à la niche écologique et à la région d'origine pour les souches sauvages (Avramova *et al.* 2018). Au contraire, certaines espèces, comme *S. bacillaris*, ne montrent pas de structuration selon la niche écologique mais uniquement par l'origine géographique (Masneuf-Pomarede *et al.* 2015 ; Raymond Eder et Rosa 2020). Pour *H. uvarum*, les résultats concernant l'influence de l'origine géographique sur la structuration de la population sont contradictoires, ce qui pourrait être lié à des collections de souches différentes (Albertin *et al.* 2015 ; Saubin *et al.* 2019). Les études de population de *P. kudriavzevii* incluent principalement des isolats cliniques, et excluent une structuration par origine géographique, les souches étudiées ne permettent pas de conclure concernant l'influence de l'habitat (Jacobsen *et al.* 2007 ; Douglass *et al.* 2018).

4. Propriétés œnologiques des levures

L'importante diversité microbienne, présente tant sur le raisin, que dans le moût et au chai, offre également une source de diversité phénotypique. Lorsque des souches sont sélectionnées pour de potentielles applications en œnologie, il est commun d'étudier leurs caractéristiques tant technologiques (capacité fermentaire, tolérance aux conditions œnologiques) que qualitatives (productions de métabolites secondaires et arômes, Rainieri et Pretorius, 2000). La diversité des espèces œnologiques permet donc d'explorer les différences de traits phénotypiques en conditions œnologiques. Parmi les traits technologiques, il est commun de vérifier leur tolérance à différents stress abiotiques comme l'éthanol, le SO₂ ou encore certains ions métalliques (Cu²⁺) qui peuvent être rencontrés au cours de la vinification. Ceci est souvent testé en milieu solide ou en mini-fermentation.

Concernant les traits qualitatifs étudiés, la production d'arômes fermentaires, mais aussi les potentielles activités enzymatiques sont étudiées. En effet, les enzymes produites par les levures vont pouvoir libérer des arômes variétaux, qui sont importants pour les propriétés organoleptiques du vin. Ceux-ci sont naturellement présents dans le moût sous forme de précurseurs non aromatiques liés à un glucose, qui peut lui-même être lié à un autre sucre (Swiegers *et al.* 2005). L'activité β -glucosidase, qui est l'une des plus étudiées, permet la libération de terpènes (e.g. linalol, géraniol) et C₁₃-norisoprénoïdes par clivage de la liaison covalente entre le glucose et le terpène. Les activités enzymatiques peuvent varier selon les espèces et parfois les souches (Swiegers et Pretorius 2005 ; Zhang *et al.* 2021) ainsi que la concentration d'azote assimilable (Seguinot *et al.* 2020). En plus de sélectionner les souches pour leur potentiel aromatique, il est aussi nécessaire de vérifier qu'elles ne risquent pas de causer des défauts dans les vins, tels que des souches associées à de forte production de H₂S (sulfure d'hydrogène). La production d'H₂S est généralement testé en milieu solide (BiGGY), à l'aide d'un indicateur coloré (de blanc à brun plus la souche produit d'H₂S). Récemment une nouvelle méthode de mesure de la production d'H₂S au cours de la fermentation alcoolique a été développée en utilisant un piège métallique et une sonde fluorescente (De Guidi *et al.* 2021).

a. *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae est la principale espèce responsable de la fermentation alcoolique, notamment car elle est particulièrement adaptée aux multiples stress liés aux conditions de fermentation (pH acide, forte concentration en sucres, en SO₂ et en éthanol; Bauer et Pretorius 2000). Les souches œnologiques tolèrent généralement 10 à 15% d'éthanol et certaines souches peuvent tolérer jusqu'à 18% (Benítez *et al.* 1983 ; Arroyo-López *et al.* 2010 ; Capece *et al.* 2012), et des concentrations en sucres jusqu'à 500 g/L (Mukherjee *et al.* 2017).

Lors de la fermentation, *S. cerevisiae* montre un rendement en éthanol très conservé entre souches d'environ 0.46, soit environ 12% d'éthanol pour un moût avec 200 g/L de sucres (Camarasa *et al.* 2011). En plus de l'éthanol, *S. cerevisiae* produit principalement du glycérol (entre 5 et 10 g/L), de l'acide acétique et de l'acétaldéhyde. Contrairement à l'éthanol, la production de ces métabolites varient entre souches et peut aussi varier selon les conditions environnementales (Nidelet *et al.* 2016 ; Chidi *et al.* 2018).

Seulement certaines souches de *S. cerevisiae* produisent des β-glucosidases toutefois, leur activité est inhibée pendant la fermentation par la présence de fortes concentrations de glucose ou d'éthanol (Swiegers *et al.* 2005). Concernant la production d'H₂S, elle est également dépendante de la souche et de la quantité d'azote et de SO₂ dans le milieu (De Guidi *et al.* 2021).

b. *Torulasporea delbrueckii*

Il s'agit d'une espèce assez proche de *S. cerevisiae*, d'un point de vue phylogénétique et phénotypique (Ramírez et Velázquez 2018). *T. delbrueckii* présente des capacités de fermentation intermédiaires et elle est d'ailleurs considérée *Crabtree positive*, comme *S. cerevisiae*, mais est plus sensible à l'anaérobie stricte (Ramírez et Velázquez 2018). Dans la plupart des cas, *T. delbrueckii* ne semble pas pouvoir compléter la fermentation et laisse généralement 10% de sucres résiduels (Ciani et Picciotti 1995 ; Renault *et al.* 2009 ; Arslan *et al.* 2018). Cependant, certains travaux rapportent des concentrations de sucres résiduels < 10 g/L pour de faibles et moyennes concentrations initiales en sucres (120 voire 200 g/L ; Ciani et Picciotti 1995 ; Taillandier *et al.* 2014). En revanche, *T. delbrueckii* est plus lente que *S. cerevisiae* pour terminer la fermentation (Comitini *et al.* 2011 ; Taillandier *et al.* 2014 ; Ramírez et Velázquez 2018). De plus, les fermentations de *T. delbrueckii* atteignent une teneur en

éthanol variant entre 6 et 10% selon les souches (Ciani et Maccarelli 1998 ; Comitini *et al.* 2011) et elle semble tolérer jusqu'à 13% d'éthanol. Toutefois cette tolérance semble réduite autour de 10% en moût synthétique (Mukherjee *et al.* 2017 ; Raymond Eder *et al.* 2017 ; Silva-Sousa *et al.* 2022). *T. delbrueckii* tolère aussi des concentrations élevées de sucres (> 550 g/L, voire 700 g/L pour le glucose ; Sipiczki 2016 ; Mukherjee *et al.* 2017) et jusqu'à 80 mg/L de SO₂ (González-Arenzana *et al.* 2017).

Enfin *T. delbrueckii* est associée en fermentation à de faibles production d'acidité volatile (entre 0.3 et 0.5 g/L d'acidité volatile), similaires ou inférieures à *S. cerevisiae* (Ciani et Maccarelli 1998 ; Renault *et al.* 2009 ; Comitini *et al.* 2011), ainsi qu'une production de glycérol plus faible que *S. cerevisiae* (Ciani et Maccarelli 1998 ; Renault *et al.* 2009). *T. delbrueckii* est cependant associée à une production d'H₂S plutôt élevée (Raymond Eder *et al.* 2017 ; Silva-Sousa *et al.* 2022) et seulement certaines souches montrent une activité β-glucosidase (Comitini *et al.* 2011 ; González-Arenzana *et al.* 2017 ; Silva-Sousa *et al.* 2022).

c. *Lachancea thermotolerans*

L. thermotolerans (anc. *Kluyveromyces thermotolerans*) est caractérisée par des capacités fermentaires intermédiaires consommant généralement jusqu'à 80% du sucre et produisant 8% d'éthanol (Kapsopoulou *et al.* 2005 ; Prior *et al.* 2019 ; Vaquero *et al.* 2020). *L. thermotolerans* montre d'ailleurs une tolérance à l'éthanol autour de 8% voire jusqu'à 12% pour certaines souches (Mukherjee *et al.* 2017 ; Binati *et al.* 2019), mais une faible résistance au SO₂, entre 10 et 20 mg/L (Comitini *et al.* 2011 ; González-Arenzana *et al.* 2017).

L. thermotolerans est beaucoup étudiée pour sa production d'acide lactique. Celle-ci est très souche-dépendante puisque dans une même étude, elle peut varier de 1 g/L à 5 g/L (Gatto *et al.* 2020) voire 16 g/L (Banilas *et al.* 2016 ; Hranilovic *et al.* 2018). Cet effet souche pourrait être corrélé à l'origine géographique ou technologique des souches (Banilas *et al.* 2016 ; Hranilovic *et al.* 2018). Une récente étude a proposé l'hypothèse selon laquelle la production d'acide lactique serait un mécanisme de régénération du NAD⁺, et qu'elle serait dépendante du niveau d'expression des gènes *LDH* (lactate déshydrogénase ; Gatto *et al.* 2020). De plus, la production d'acide lactique par *L. thermotolerans* est très dépendante des conditions des fermentations, notamment de la quantité d'azote présent et de la taille de la population (Morata *et al.* 2018 ; Vaquero *et al.* 2020)

Enfin, *L. thermotolerans* produit relativement peu d'acide volatile et d'acide acétique, entre 0.2 et 0.5 g/L selon les études, ce qui est généralement moitié moins comparé à *S. cerevisiae*. (Kapsopoulou *et al.* 2005 ; Comitini *et al.* 2011 ; Hranilovic *et al.* 2018). En revanche, elle est associée à une forte production d'H₂S. L'activité glucosidase de *L. thermotolerans* est souche-dépendante, et elle ne présente pas d'activité protéase (Comitini *et al.* 2011 ; Binati *et al.* 2019).

d. *Hanseniaspora uvarum*

Hanseniaspora est un genre très diversifié comptant à ce jour 22 espèces dont *H. uvarum* (*anc. Kloeckera apiculata*) très présente en début de fermentation (Van Wyk *et al.* 2023). Il se distingue notamment par la morphologie des cellules qui est dite « apiculée », caractérisée par un bourgeonnement bipolaire et une forme plus allongée ressemblant à un citron (Cadez et Smith 2011).

H. uvarum présente une faible capacité fermentaire et laisse entre 20 et 35% de sucres résiduels (Ciani et Maccarelli 1998 ; Mendoza *et al.* 2019 ; Harlé *et al.* 2020). Elle atteint des concentrations d'éthanol entre 5 et 10% qui correspondent à la concentration qu'elle tolère (Rossouw et Bauer 2016 ; Mukherjee *et al.* 2017 ; Mendoza *et al.* 2019). Elle est généralement considérée comme une levure d'altération due à sa forte production d'acide acétique qui cause un défaut « vinaigré » au vin (Ciani et Maccarelli 1998 ; Harlé *et al.* 2020). Toutefois, cette production d'acide acétique varie énormément selon la souche (Capece *et al.* 2005 ; Johnson *et al.* 2020). De la même manière la production de glycérol, d'acide pyruvique et d'acide succinique est très souche-dépendante et généralement supérieure à celle de *S. cerevisiae* (Romano *et al.* 1997 ; Ciani et Maccarelli 1998 ; Rossouw et Bauer 2016 ; Harlé *et al.* 2020). Enfin, cette diversité intraspécifique se retrouve pour l'activité β -glucosidase (Capece *et al.* 2005 ; Martin *et al.* 2018), sa tolérance aux sucres (Sipiczki 2016 ; Mukherjee *et al.* 2017) ainsi que sa résistance au SO₂ (Guaragnella *et al.* 2019 ; Mendoza *et al.* 2019).

e. *Starmerella bacillaris*

S. bacillaris (*anc. Candida zemplinina*) est une espèce assez remarquable de par ses propriétés fermentaires. En effet, en plus de son caractère osmotolérant et cryotolérant (Csoma *et al.* 2020 ; Raymond Eder et Rosa 2021), cette espèce est fructophile, c'est-à-dire qu'elle consomme préférentiellement le fructose, notamment dans le moût (Englezos *et al.*

2015 ; Di Maio *et al.* 2016 ; Wang *et al.* 2016). Cette fructophilie serait en partie liée à la présence de gènes homologues à *FFZ1* codant pour un transporteur de fructose qui est essentiel au caractère fructophile chez *Zygosacharomyces rouxii* (Leandro *et al.* 2014 ; Gonçalves *et al.* 2018). En revanche, elle n'est pas capable de consommer tout le glucose dans le moût et fermente assez peu (Dequin *et al.* 2017 ; Englezos *et al.* 2018), donnant des vins avec environ 5 % d'éthanol (Rantsiou *et al.* 2012). Les souches de *S. bacillaris* montrent d'ailleurs une résistance à l'éthanol de 8-10% d'éthanol, avec certaines souches pouvant tolérer jusqu'à 12% (Englezos *et al.* 2018 ; Binati *et al.* 2019).

Contrairement à *S. cerevisiae*, *S. bacillaris* semble peu orienter son flux carboné vers l'acétaldéhyde (ensuite réduit en éthanol) causant l'accumulation d'acide pyruvique et de glycérol (Englezos *et al.* 2018). Elle est donc associée à un fort rendement en glycérol et une libération importante d'acide pyruvique dans le milieu en cours de fermentation (Magyar *et al.* 2014 ; Di Maio *et al.* 2016), et une assez faible production d'acide acétique.

Enfin, *S. bacillaris* ne semble pas avoir d'activité β -glucosidase et une production moyenne à importante d'H₂S selon les souches (Englezos *et al.* 2015 ; Di Maio *et al.* 2016 ; Raymond Eder *et al.* 2018 ; Binati *et al.* 2019).

f. *Metschnikowia pulcherrima*

Les espèces du genre *Metschnikowia* sont connues pour leur faible capacité fermentaire (Prior *et al.* 2019 ; Harlé *et al.* 2020) et une faible résistance à l'éthanol (< 8 % ; Mukherjee *et al.* 2017 ; Binati *et al.* 2019) qui pourrait en partie expliquer sa rapide décroissance lors de la fermentation. Par contre, *M. pulcherrima* est relativement osmotolérante puisque des études ont montré une croissance possible avec plus de 550 g/L de sucres (glucose ou fructose). Elle a aussi été isolée de vin de Tokaj (Mukherjee *et al.* 2017 ; Csoma *et al.* 2020). Elle semble plutôt sensible au SO₂ même si certaines souches tolèrent jusqu'à 40 mg/L (Comitini *et al.* 2011 ; González-Arenzana *et al.* 2017).

Concernant son métabolisme, *M. pulcherrima* seule semble montrer un faible rendement en acidité volatile, même si cela pourrait être influencé par la quantité d'azote assimilable disponible (Barbosa *et al.* 2018 ; Seguinot *et al.* 2020). De plus, cet effet ne se retrouve pas en inoculation avec *S. cerevisiae* en moût naturel (Vicente *et al.* 2020). Comme d'autres espèces avec un faible rendement en éthanol, *M. pulcherrima* tend à avoir un rendement en glycérol plus important que *S. cerevisiae* (Harlé *et al.* 2020 ; Seguinot *et al.* 2020

; Vicente *et al.* 2020) mais le réel impact de telles augmentations de glycérol sur les propriétés organoleptiques du vin reste à déterminer (Swiegers *et al.* 2005). *M. pulcherrima* est également associée à de hauts rendements en acide pyruvique et α -cétoglutarique comparé à une souche œnologique de *S. cerevisiae* (Harlé *et al.* 2020). La production d'H₂S peut varier entre souche de *M. pulcherrima* mais reste généralement faible ou moyenne (Comitini *et al.* 2011 ; Binati *et al.* 2019). Quant à l'activité β -glucosidase, plusieurs souches présentent cette activité, même en conditions œnologiques (González-Arenzana *et al.* 2017 ; Binati *et al.* 2019), mais aucune souche ne semble présenter d'activité protéase (Comitini *et al.* 2011 ; Barbosa *et al.* 2018).

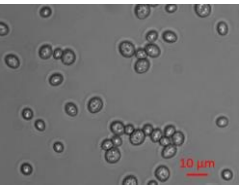
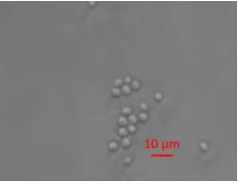
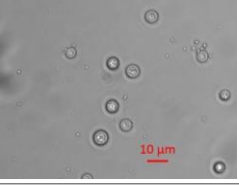
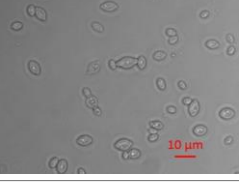
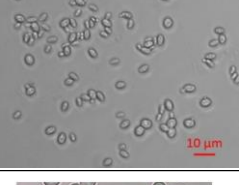


g. *Pichia kudriavzevii*

P. kudriavzevii (*anc. Issatchenkia orientalis*), ainsi que d'autres levures du genre *Pichia*, sont fréquemment isolées de moût de raisin, mais généralement en faible abondance (Drumonde-Neves *et al.* 2021). Elle peut être associée à la formation de films de surface, liée au développement important de pseudo-hyphes (Oberoi *et al.* 2012 ; Scansani *et al.* 2022). *P. kudriavzevii* est également étudiée pour des applications en biotechnologies du fait de sa thermotolérance (croissance à 40°C), de sa tolérance à de fortes concentrations en éthanol (jusqu'à 13%) et à certains composés toxiques comme le furfural (Mukherjee *et al.* 2017 ; Chu *et al.* 2023). Elle permet, par exemple, d'obtenir de meilleurs rendements en éthanol que *S. cerevisiae* lors de fermentation à haute température (jusqu'à 45°C), en faisant une bonne candidate pour la production de bioéthanol (Oberoi *et al.* 2012).

Même si *P. kudriavzevii* est encore peu étudié en œnologie, elle pourrait présenter un intérêt car elle a un rendement élevé en glycérol, probablement lié à son osmotolérance (Del Mónaco *et al.* 2014 ; Shi *et al.* 2019 ; Vicente *et al.* 2021). De plus, sous certaines conditions, elle est capable de consommer totalement l'acide malique et de le convertir en acide lactique (fermentation malolactique). Ceci permet une réduction de l'acidité lors de la fermentation (Del Mónaco *et al.* 2014 ; Steyn *et al.* 2021). En revanche, cette consommation totale n'est pas toujours observée, ce qui pourrait être lié à des différences de disponibilités en oxygène, d'inhibition par la présence de glucose ou encore de variations possibles entre souches (Del Mónaco *et al.* 2014 ; Scansani *et al.* 2022). *P. kudriavzevii* montre une activité protéase et certaines souches semblent avoir une activité β -glucosidase même si une autre étude ne

trouve aucune des 67 souches testées ayant une activité β -glucosidase (Del Mónaco *et al.* 2014 ; Polizzotto *et al.* 2016).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des caractéristiques les plus saillantes de sept espèces de levures incluses dans ce travail. Les images microscopie ont été réalisées avec un microscope Imager.A2 équipé d'une caméra AxioCam MRm (Zeiss, Göttingen, Allemagne). *D'après Roudil *et al.*, 2020

Espèce	Microscopie	Capacité fermentaire en condition œnologique	Spécificité	Nombres de starter NS commerciaux disponibles*	Références
Sc		Forte	Envahit rapidement le milieu		Camarasa <i>et al.</i> 2011
Td		Intermédiaire	Faible production d'acide acétique	8 souches seules 4 mix	Ramírez <i>et Velázquez</i> 2018
Lt		Intermédiaire	Production d'acide lactique	2 souches seules 4 mix	Morata <i>et al.</i> 2018; Porter <i>et al.</i> 2019
Hu		Faible	Production d'acide acétique	0	van Wyk, 2023
Sb		Faible	Fort rendement en glycérol	1 souche seule	Englezos, 2017; Raymond Eder 2021
Mp	 Morata <i>et al.</i> , 2019 Barre = 10µm	Faible	Production d'acide pulcherriminique	1 souche seule 1 mix	Vicente, 2020; Sipiczki, 2020
Pku		Faible	Formation de films de surface ; consommation de l'acide malique	0	Vicente, 2021;

5. Applications des non-*Saccharomyces* en œnologie

Les possibles applications des non-*Saccharomyces* sont multiples comme le montrent les recommandations attribuées aux LSA commerciales (Roudil *et al.* 2020). En effet, comme décrit plus tôt, les non-*Saccharomyces* présentent des métabolismes différents et une diversité phénotypique dont on cherche aujourd'hui à tirer avantage. Ainsi, de plus en plus d'études portent sur le développement d'alternatives à l'inoculation de *S. cerevisiae* seule. Par exemple, en retournant à l'utilisation des fermentations indigènes ou en développant des fermentations mixtes. Les fermentations mixtes associent une ou deux espèces de non-*Saccharomyces* avec *S. cerevisiae* ; les espèces sont soit inoculées en même temps (co-inoculation) ou *S. cerevisiae* est inoculée avec quelques jours de décalage (inoculation séquentielle, Ciani *et al.* 2010).

Un des principaux objectifs dans l'utilisation de non-*Saccharomyces* est l'augmentation de la complexité aromatique du vin. Les études sur le profil aromatique des vins en fermentations indigènes semblent indiquer que cette méthode pourrait significativement augmenter la complexité aromatique, notamment les notes fruitées (Lambrechts et Pretorius 2000 ; Patrignani *et al.* 2017 ; Çelebi Uzkuç *et al.* 2020). D'autre part, concernant les fermentations mixtes, *T. delbrueckii* en co-inoculation avec *S. cerevisiae* ont été associées à une augmentation de l'acétate d'isoamyle et de la quantité totale d'ester (Renault *et al.* 2015 ; Ramírez et Velázquez 2018). Lié à son métabolisme, des fermentations mixtes de *S. bacillaris* avec *S. cerevisiae* montrent une augmentation de la teneur en glycérol (Englezos *et al.* 2017), même si cette augmentation n'est probablement pas suffisante pour être détectable d'un point de vue sensoriel (Swiegers *et al.* 2005).

Les non-*Saccharomyces* peuvent aussi être une solution biotechnologique pour répondre aux défis rencontrés en vinification. *M. pulcherrima* et *S. bacillaris* sont particulièrement étudiées pour diminuer le taux d'éthanol en fin de fermentation. Il faudra toutefois noter que les réductions observées en adoptant cette stratégie restent limitées (généralement inférieures à 1.5 % ; Ciani *et al.* 2016a ; Binati *et al.* 2020 ; Ivit *et al.* 2020). Des espèces sont également étudiées pour leur potentiel acidifiant comme *L. thermotolerans* qui est connu pour produire de l'acide lactique. Par exemple, Gobbi *et al.* (2013) ont observé une augmentation de 2 g/L d'acidité totale lors de fermentations mixtes entre *L. thermotolerans* et *S. cerevisiae*. L'utilisation de cette espèce pourrait ainsi être utilisée dans les régions plus

chaudes où les vins tendent à avoir une acidité réduite (Morata *et al.* 2018). D'ailleurs, il existe déjà plusieurs souches commerciales, qui seraient conseillées pour de telles applications (Roudil *et al.* 2020). Bien que les non-*Saccharomyces* présentent une opportunité d'améliorer les propriétés organoleptiques du vin, certaines souches peuvent parfois causer des défauts, même en fermentation mixte avec *S. cerevisiae*, comme une forte production d'H₂S (Lambrechts et Pretorius 2000).

Il est aussi important de noter que les résultats sur l'effet de fermentations mixtes sur la production d'arômes peuvent être contradictoires. En effet, les réels effets dépendent de nombreux facteurs tels que l'échelle de fermentation, le cépage, le sulfitage, la température, les souches utilisées, etc. Un des paramètres les plus importants sur l'impact de fermentation mixte est la stratégie d'inoculation (Ciani *et al.* 2016b). Ainsi, Renault *et al.* (2015) ont trouvé que *T. delbrueckii* pouvait significativement augmenter l'acétate d'isoamyle uniquement dans le cas de so-inoculation avec *S. cerevisiae*. En revanche, d'autres études sur *L. thermotolerans* et *S. bacillaris* montrent une influence plus importante de la souche de NS utilisée lors de fermentation séquentielle, probablement liée à une présence plus longue de la NS (Rantsiou *et al.* 2012 ; Gobbi *et al.* 2013). Toutefois, cela peut ensuite comporter des risques de mauvaise implantation de *S. cerevisiae* si elle n'a pas assez de ressources (Taillandier *et al.* 2014). Il est donc primordial de bien connaître l'impact de chaque espèce de NS en co-inoculation et inoculation séquentielle. Une autre stratégie est la co-inoculation avec *S. cerevisiae* en plus faible quantité. Par exemple, Comitini *et al.* (2011), ont montré qu'en co-inoculant *S. cerevisiae* avec 10³ ou 10⁵ cellules/mL au lieu de 10⁷, une plus importante production de glycérol était observée avec *M. pulcherrima*, *S. bacillaris* et une plus forte augmentation de l'acidité pour *L. thermotolerans*. Des différences de réduction et de production d'arômes ont aussi été observées dans des fermentations mixtes avec *T. delbrueckii* avec des ratio d'inoculation faible de *S. cerevisiae* et inoculation séquentielle (Bely *et al.* 2008 ; Taillandier *et al.* 2014).

Par ailleurs, les facteurs intrinsèques au moût tels que les sucres, l'azote assimilable, les lipides et les vitamines peuvent varier d'une étude à l'autre. En moût synthétique, il a été montré un effet de l'azote et des sucres sur des fermentations séquentielles de *M. pulcherrima* avec *S. cerevisiae* (Seguinot *et al.* 2020). L'azote disponible est connu pour jouer un rôle majeur dans la production des arômes (Mouret *et al.* 2014). Il peut aussi exister des différences entre les résultats obtenus en moût synthétique en laboratoire et les résultats en

moûts naturels puisque la composition de ces derniers est beaucoup plus complexe et qu'ils comportent des précurseurs d'arômes variétaux, les effets de la fermentation mixtes sont alors beaucoup plus difficiles à prédire (González-Royo *et al.* 2015 ; Bagheri *et al.* 2016 ; Seguinot 2019). Par ailleurs, il faut également vérifier le réel impact des fermentations mixtes par une analyse sensorielle, au-delà des simples concentrations en arômes. Par exemple, dans l'article de Binati *et al.* (2020), les fermentations mixtes avec *S. bacillaris*, *M. pulcherrima* et *L. thermotolerans* se distinguent de *S. cerevisiae* seule lors de l'analyse sensorielle. Cependant, les fermentations mixtes de *L. thermotolerans* et *S. cerevisiae* ne se distinguaient pas de celles avec *M. pulcherrima* ou *S. bacillaris*, tandis que Tronchoni *et al.* (2018) trouvent que des vins issus d'inoculations séquentielles de *T. delbrueckii* et *M. pulcherrima* sont bien distinguables.

Les non-*Saccharomyces* pourraient également influencer sur d'autres propriétés organoleptiques du vin telles que la couleur. En effet, des études montrent que certaines espèces de non-*Saccharomyces*, produisant de fortes concentrations d'acide pyruvique, peuvent aider à stabiliser la couleur des vins rouges. Ce phénomène serait lié à la réaction entre l'acide pyruvique et les anthocyanes, formant des pyranoanthocyanes plus stables (Morata *et al.* 2019). De plus, les levures libèrent des mannoprotéines, qui peuvent à la fois aider à la stabilisation de la couleur et éviter la précipitation des protéines, mais qui peuvent aussi adsorber les polyphénols lors d'élevage sur lie réduisant leurs concentrations dans le vin. Il semblerait que les capacités d'adsorption des mannoprotéines, et donc leur influence sur la couleur, varient selon l'espèce (Tofalo *et al.* 2021). Les mannoprotéines peuvent également influencer l'astringence ou la sensation en bouche (Domizio *et al.* 2014).

Enfin, les non-*Saccharomyces* sont également utilisées dans un objectif de bioprotection qui correspond à l'utilisation d'un micro-organisme ou d'un de ses produits dérivés pour limiter la croissance d'organismes d'altération (Gianvito *et al.* 2022). Un des genres les plus étudiés à l'heure actuelle pour la bioprotection en œnologie est *Metschnikowia*. En effet de nombreuses espèces dont *M. pulcherrima* sont associées à la production d'acide pulcherriminique qui aurait la capacité à capter le fer, limitant la croissance de nombreux micro-organismes d'altération (Sipiczki 2020). D'autres mécanismes sont possiblement impliqués, comme la consommation rapide de l'oxygène, limitant la croissance des bactéries aérobies (Windholtz *et al.* 2023). D'ailleurs, *M. pulcherrima* semble aussi pouvoir moduler la production d'acide acétique par *H. uvarum* (Johnson *et al.* 2020). D'autres espèces comme *T.*

delbrueckii ou *S. bacillaris* ont également démontré des propriétés de bioprotection (Lemos *et al.* 2016 ; Simonin *et al.* 2018 ; Windholtz *et al.* 2021b ; Gianvito *et al.* 2022).

III. Méthodes de suivi de dynamique des communautés

L'étude des communautés naturelles et synthétiques nécessite l'identification des micro-organismes présents ainsi que la détermination de leur abondance relative au cours du procédé de fermentation.

1. Échantillonnage

La récolte des micro-organismes est une étape déterminante pour leur détection dans les communautés naturelles et particulièrement dans le domaine œnologique. L'échantillonnage peut être fait à partir de baies ou grappes prélevées stérilement ou directement depuis des moûts, puis en cours de fermentation.

Lors de l'étude de la diversité des micro-organismes présents sur le raisin, de nombreuses études récoltent quelques grappes de raisin sain (entre 2 et 5 kg) au sein d'une parcelle (Li *et al.* 2011 ; Milanović *et al.* 2013 ; Padilla *et al.* 2016) avant de les presser et de réaliser des mini-fermentations (250mL à 2L). Cependant, il a été montré qu'une importante variabilité de la diversité des levures existe au sein même d'une parcelle (Setati *et al.* 2012) ce qui peut donc fausser les comparaisons entre parcelles lors d'un échantillonnage limité à quelques points isolés. De plus, plus l'échantillon prélevé est petit, plus les biais risquent d'être importants, ce qui peut conduire à des fermentations en absence totale de levures *Saccharomyces* (Agarbati *et al.* 2019). Le volume de raisin prélevé, ainsi que le plan des points d'échantillonnage sont donc des paramètres cruciaux pour limiter les biais expérimentaux. Pour l'étude des moûts, les fermentations peuvent être effectuées à différentes échelles: en chai expérimentaux (Hierro *et al.* 2006 ; Maturano *et al.* 2015 ; Grangeteau *et al.* 2017), en mini-fermentation en laboratoire depuis des moûts provenant de chai industriel (Morgan *et al.* 2019) ou directement par prélèvement en chai (Díaz *et al.* 2013).

Une fois l'échantillon de moût prélevé, plusieurs méthodes peuvent être adoptées pour l'identification des espèces et de leur abondance, souvent séparées selon qu'elles sont culture-dépendantes ou culture-indépendantes (Raja *et al.* 2017).

2. Méthodes cultures-dépendantes

Les méthodes cultures-dépendantes passent par une première étape d'isolement, généralement sur milieu solide, des différents micro-organismes. Le milieu d'isolement utilisé peut être un milieu « générique » peu sélectif, permettant la croissance d'un grand nombre d'espèces de levures ou bactéries supplémentés en antibiotiques (ex : chloramphénicol) ou antifongiques (ex : biphényle) pour limiter la croissance de bactéries et champignons filamenteux respectivement. Les milieux les plus communs sont l'YPD (Yeast Peptone Dextrose) pour les levures totales, le milieu L-lysine agar pour les levures non-*Saccharomyces* et le MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) pour les bactéries lactiques. Des milieux « différentiels » sont également utilisés pour faire une première distinction entre espèces. Ces milieux tels que le milieu WL (Wallerstein), ChromAgar Candida (Loira *et al.* 2020), qui permettent de distinguer différentes espèces selon l'aspect des colonies, notamment grâce à la présence de chromogènes (vert de bromocrésol dans le WL, et un mélange pour le CHROMagar). Quelques articles se limitent à une identification sur milieu différentiel. Cependant, l'identification n'est alors que partielle puisque différentes morphologies peuvent parfois correspondre à une même espèce (Li *et al.* 2011 ; Csoma *et al.* 2020), et le milieu différentiel sert plus souvent à regrouper et dénombrer les colonies selon un type de morphologie.

Ainsi, l'isolement est habituellement complété d'une identification moléculaire, de quelques dizaines à l'ensemble des colonies, basée sur des différences de séquences sur certains marqueurs moléculaires, le plus souvent la région des ITS (Internal Transcribed Spacer) ou les régions D1/D2 de l'ADN ribosomique 26S (Figure 5). Ces marqueurs présentent assez de variabilités pour distinguer les différentes espèces (Loira *et al.* 2020). Ceux-ci peuvent être caractérisés par digestion enzymatique avec les enzymes *Cfo1*, *HaeIII*, *HinfI* (PCR-RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism, (Esteve-Zarzoso 1999 ; Zott *et al.* 2008) ou par séquençage SANGER et alignement aux séquences disponibles sur les bases de données (Setati *et al.* 2012 ; Maturano *et al.* 2015).

Ces marqueurs moléculaires ont toutefois certaines limites et l'identification d'espèces proches n'est parfois pas possible par une méthode unique. Par exemple, la méthode par PCR-RFLP des ITS ne distingue pas *S. bacillaris* et *Starmerella stellata* (Brysch-Herzberg et Seidel 2015), ou encore, l'utilisation des domaines D1/D2 ne distingue pas *Kluyveromyces lactis* et *K. marxianus* (Polizzotto *et al.* 2016). C'est pourquoi, certaines études combinent l'utilisation de

plusieurs approches (Di Maro *et al.* 2007). De plus, pour le genre *Metschnikowia*, les marqueurs ITS et D1/D2 ne sont pas suffisants pour l'identification exacte des espèces, et d'autres marqueurs comme les gènes *ACT1* ou *RPB2* sont parfois utilisés, même si les séquences présentent souvent des nucléotides ambigus chez *M. pulcherrima* (Sipiczki 2020).

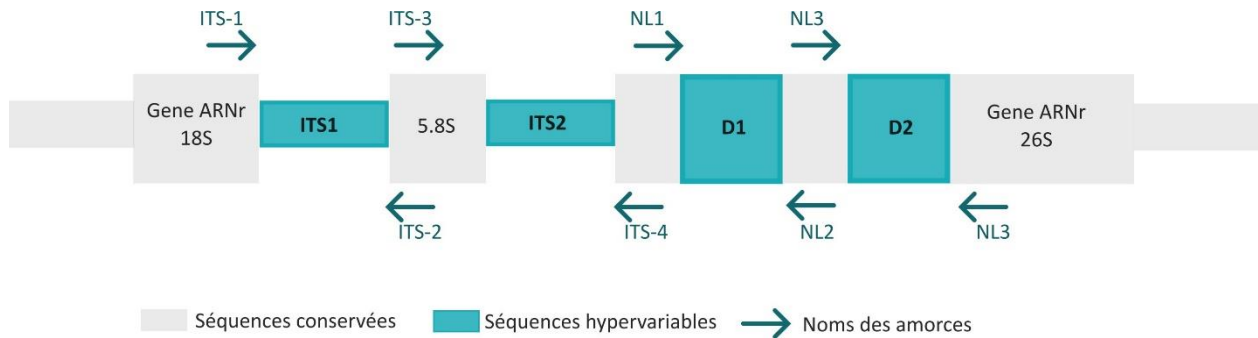


Figure 5 : Schéma des régions du complexe des gènes ribosomiaux. La localisation des amorces les plus communément utilisées pour l'amplification des ITS ou domaine D1/D2 est indiquée par des flèches. (Adapté de Arbefeville *et al.* 2017)

Après son application réussie dans le domaine médical (Croxatto *et al.* 2012), la méthode d'identification de levure par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight) se développe dans le domaine de l'alimentation, notamment pour explorer la diversité microbienne en œnologie (Windholtz *et al.* 2021a). Cette méthode permet l'obtention de signature moléculaire sur les spectres issus de l'analyse de l'extrait protéique de colonies, ces profils étant spécifiques à l'espèce (Qian *et al.* 2008 ; Croxatto *et al.* 2012).

L'utilisation de méthodes culture-dépendantes est lié à des biais de croissance, puisque ces méthodes vont tendre à favoriser la détection des espèces cultivables, ainsi que les espèces avec une meilleure croissance. De plus, l'étape de culture peut parfois demander plusieurs jours. C'est pour ces raisons que de plus en plus d'articles se basent sur une méthode culture-indépendante (Ciani et Comitini 2019 : chap. 3).

3. Méthodes cultures-indépendantes

Le terme de méthodes cultures-indépendantes regroupe plusieurs techniques permettant l'identification des micro-organismes sans culture préalable, notamment depuis l'ADN directement extrait de l'échantillon.

Par exemple, la PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) permet la séparation de fragments amplifiés à partir de l'échantillon, la région D1/D2 pour les levures,

selon leur séquence grâce à un gradient de concentration d'agent dénaturant (urée et formamide, Nisiotou *et al.* 2007 ; Renouf *et al.* 2007). La méthode ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) permet l'identification des espèces présentes grâce à la taille des ITS (Bagheri *et al.* 2017). Les ITS sont amplifiés par PCR puis séparés par électrophorèse capillaire et détection automatique (Nocker *et al.* 2007).

Désormais, les méthodes haut-débit, comme le métabarcoding, sont de plus en plus utilisées. Le métabarcoding se base sur le séquençage d'un marqueur moléculaire (ITS ou D1/D2) après amplification avec des amorces marquées par un fluorochrome. Les séquences obtenues sont regroupées en OTU (unité taxonomique fonctionnelle) regroupant les séquences similaires. Après traitement des données, la confrontation aux bases de données permet d'assigner les OTUs à un genre ou une espèce (l'identification dépend de la qualité des bases de données, qui sont aujourd'hui de plus en plus complètes ; Raja *et al.* 2017). Le métabarcoding est sujet à des biais d'extraction et d'amplification puisque certaines espèces sont moins sensibles aux méthodes d'extraction, et que les fragments plus petits ont tendance à être favorisés lors des étapes de PCR. Une identification plus précise peut être obtenue par séquençage métagénomique shotgun qui se base sur le séquençage de l'ensemble des génomes présents, cette méthode étant de plus en plus utilisée (Sternes *et al.* 2017).

Lorsque l'on cherche à quantifier des espèces spécifiques dans un échantillon, il est aussi possible d'avoir recours à la qPCR (PCR quantitative). Pour cela, il faut développer des amorces permettant l'amplification d'un fragment spécifique à chaque espèce cible. La quantification des cellules dans l'échantillon est permise grâce à une courbe de calibrage calculée en amont (Hierro *et al.* 2007).

4. Cytométrie en flux

La détection et quantification d'espèces spécifiques dans des échantillons œnologiques peuvent aussi se baser sur des méthodes de cytométrie en flux.

La cytométrie en flux se base sur la caractérisation de particules uniques, appelées événements, et se divise en 3 composantes : les parties fluidiques, optiques et électroniques (Figure 6). La partie **fluidique** permet d'aligner les cellules pour qu'une seule cellule soit analysée au niveau du point d'interrogation. Chaque cellule est alors soumise à différents faisceaux lasers, la lumière qu'elle renvoie est ensuite décomposée en passant par différents

filtres dichroïques et va dépendre de la taille, granulosité et fluorescence de la cellule. La configuration **optique**, c'est-à-dire la combinaison des différents lasers et filtres, varie entre cytomètres et permet la détection de différentes longueurs d'ondes. Les signaux lumineux sont ensuite captés par des **photodétecteurs** (PMT : Tube PhotoMultiplificateur) et peuvent être analysés (Macey 2007 ; Longin *et al.* 2017).

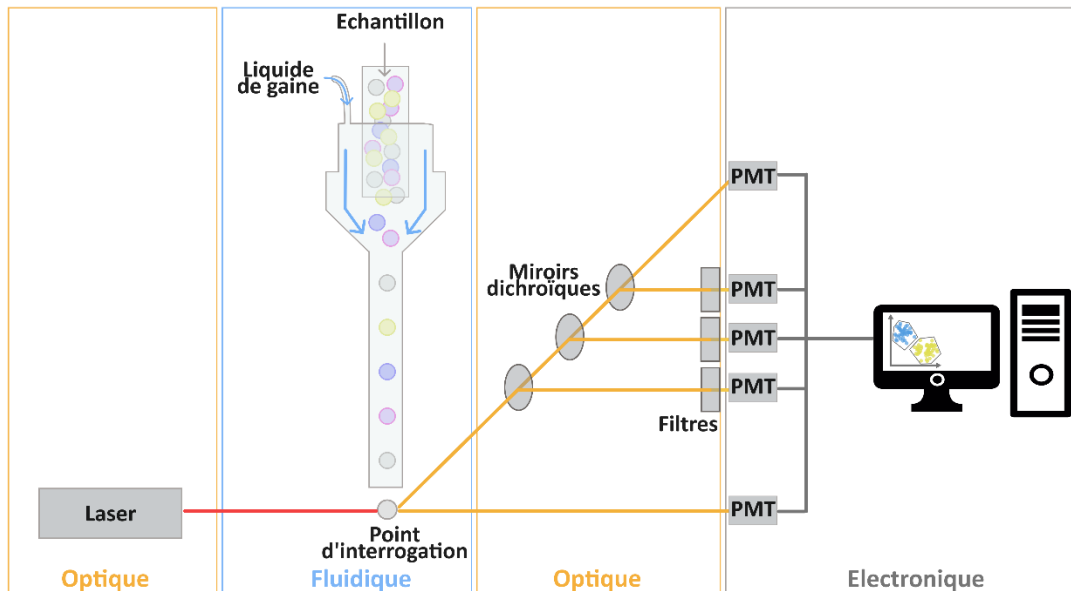


Figure 6 : Principe de la cytométrie. Le système se divise en trois composantes : optique (configuration des lasers et filtres), fluïdique (transport de l'échantillon) et électronique (détection et analyse des signaux). PMT : Photo Multiplificateur Tube. (Adapté de Longin *et al.* 2018).

La cytométrie a notamment été appliquée pour la quantification des levures et bactéries dans des échantillons de vin, après marquage des cellules avec du FDA (Fluoresceïn diacétate) pour les distinguer du bruit (Malacrino *et al.* 2001). La cytométrie permet également d'évaluer l'état physiologique des cellules (mortalité, vitalité, etc) par l'utilisation d'indicateurs colorés spécifiques comme l'iodure de propidium, ou l'estérase 5-carboxyfluoresceïn diacétate (CFDA; Longin *et al.* 2017). La détection d'une espèce en particulier nécessite l'utilisation de marquage spécifique. En communauté naturelle, la cytométrie est par exemple utilisée par les laboratoires d'analyse œnologique pour la détection de la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis*. Des méthodes de marquage FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) utilisant des sondes nucléiques pouvant s'hybrider spécifiquement à la séquence 26S de *B. bruxellensis* ou des kits utilisant des anticorps spécifiques à *B. bruxellensis* ont notamment été mis au point (Serpaggi *et al.* 2010 ; De Bellis *et al.* 2022). La méthode FISH a aussi été développée pour d'autres espèces telles que *S. cerevisiae* et *Hanseniaspora guillermondii* en fermentation

mixte (Andorra *et al.* 2011). Concernant les fermentations mixtes étudiées en laboratoire, le suivi des espèces peut aussi être permis par marquage des différentes espèces impliquées avec des protéines fluorescentes (FP). Les gènes des FP sont intégrés dans le génome de la levure ou exprimés depuis un plasmide épisomal. Selon le promoteur utilisé, la fluorescence peut être exprimée constitutivement, simplifiant la procédure de détection au cytomètre. Ces techniques permettent d'étudier la *fitness* de différentes espèces en co-cultures (Marsit et Dequin 2015 ; Harlé *et al.* 2020). En combinant trois FP, cette stratégie a été récemment appliquée pour l'étude de système à quatre espèces afin d'étudier les interactions entre levures en système complexe (Conacher *et al.* 2020).

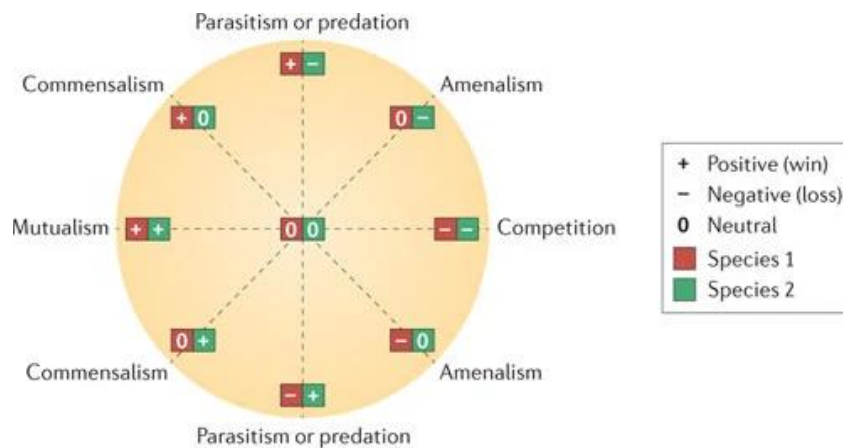
IV. Interactions au sein des communautés microbiennes

1. Définitions

On peut définir une interaction entre deux micro-organismes comme l'observation d'un changement de phénotype, chez au moins l'un de ces deux micro-organismes, lorsqu'ils sont en combinaison comparé à leur culture isolée. La fitness, liée à la survie et la multiplication des individus, est le phénotype le plus largement considéré (Mitra et Foster 2013). Il est ensuite possible de classifier les interactions, notamment selon leurs effets sur chacun des deux organismes impliqués : la compétition (--), l'amensalisme (-0), le parasitisme ou la prédation (-+), le commensalisme (0+) et le mutualisme (++) (Figure 7, Faust et Raes 2012). D'autres classifications des interactions existent et peuvent par exemple se baser sur une approche plus mécanistique, ou sur l'aspect obligatoire de l'interaction (Tuininga 2005 ; Dolinšek *et al.* 2016).

Les interactions peuvent être étudiées via différents phénotypes. La fitness peut être directement étudiée via la dynamique de chaque population (Wolfe *et al.* 2014 ; Venturelli *et al.* 2018 ; Aranda-Díaz *et al.* 2020 ; Giri *et al.* 2021). Les interactions sont également souvent extrapolées à partir de réseau d'interactions généré depuis des données de communautés naturelles et qui mettent en évidence de possibles cooccurrences ou exclusions mutuelles (Faust et Raes 2012). De plus, ces résultats sont généralement complétés par une analyse fonctionnelle des interactions. Par exemple, en comparant les mono- et co-cultures selon les métabolites consommés et produits (DiMucci *et al.* 2018 ; Carbonetto *et al.* 2020 ; Gao *et*

al. 2021), leur production de CO₂ (Foster et Bell 2012), ou encore la formation de biofilms (Pereira-Cenci *et al.* 2008 ; Lohse *et al.* 2018). L'obtention de données métaboliques permet notamment d'élucider certains mécanismes d'interactions comme la compétition pour certains nutriments ou le cross-feeding (utilisation de métabolites libérés par un autre organisme ; Mee *et al.* 2014 ; DiMucci *et al.* 2018 ; Zengler et Zaramela 2018).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 7 : Classification des interactions selon que celles-ci sont positives (+), neutres (0) ou négatives (-) pour chacun des deux organismes impliqués (Faust et Raes 2012, avec la permission de Springer Nature)

Il est important de noter que les interactions ne sont pas fixes et peuvent être modulées par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. Ainsi, les conditions environnementales, déterminées par des variations temporelles et des gradients spatiaux, vont intervenir dans le résultat des interactions (Chamberlain *et al.* 2014 ; Stubbendieck *et al.* 2016). Par exemple, il a été montré avec des co-cultures modèles que le type d'interaction entre deux micro-organismes peut être modifié par les ressources disponibles ou la présence de toxines (Hoek *et al.* 2016 ; Piccardi *et al.* 2019 ; Gao *et al.* 2021). La présence d'autres micro-organismes peut également impacter les interactions entre deux micro-organismes, ce qui est défini par le terme d'interaction d'ordre supérieur (**Figure 8**, Bairey *et al.* 2016 ; Ludington 2022).

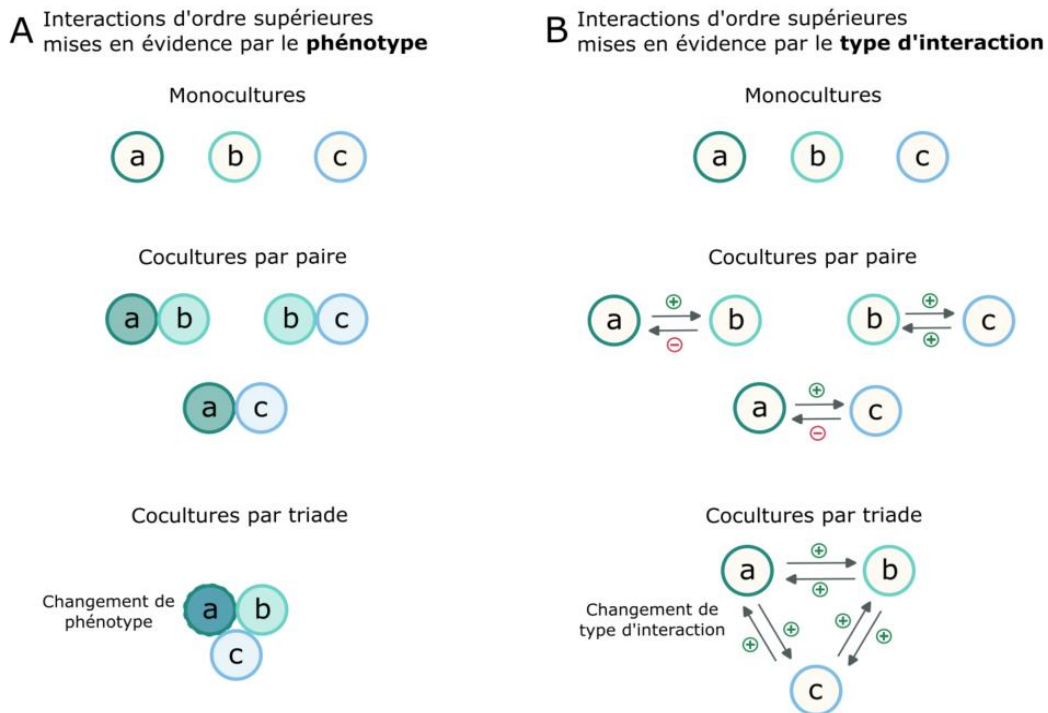


Figure 8 : Les interactions d'ordre supérieur correspondent à des modifications non prédictibles à partir d'interactions par paires du phénotype (A) ou de la fitness (B) des espèces (adapté de Ludington 2022).

2. Interactions observées pendant la fermentation alcoolique du vin

a. Compétitions pour les nutriments

Lors de la fermentation, plusieurs ressources peuvent être limitantes, ralentissant la croissance des levures non-*Saccharomyces* comme *S. cerevisiae* lorsqu'elles sont en quantité insuffisante. Par exemple, Holm Hansen *et al.* (2001) ont montré que *T. delbrueckii* et *L. thermotolerans* survivaient plus longtemps en co-cultures avec *S. cerevisiae* en présence d'oxygène. Ainsi, une compétition pour l'oxygène pourrait intervenir dans les interactions entre levures au cours de la fermentation (Ciani et Comitini 2015 ; Albergaria et Arneborg 2016).

Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence des problèmes de fermentation languissante dû à des phénomènes de compétition pour l'azote et les vitamines entre les non-*Saccharomyces* (*K. marxianus*, *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii*) et *S. cerevisiae* (Medina *et al.* 2012 ; Rollero *et al.* 2018 ; Prior *et al.* 2019 ; Harlé *et al.* 2020).

Des travaux étudiant les besoins en azote de différentes espèces de levures permettent de comprendre les préférences de chacune et les acides aminés pouvant être particulièrement limitants (Gobert *et al.* 2019). *S. cerevisiae* consomme en premier la lysine, puis l'aspartate, la thréonine, le glutamate, la leucine, l'histidine, la méthionine, l'isoleucine, la sérine, la glutamine, la phénylalanine. Les sources d'azote consommées ensuite sont l'ammonium, l'arginine, l'alanine et la glycine (Crépin *et al.* 2012).

Concernant les espèces non-*Saccharomyces*, il a été montré que *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* partagent une certaine similarité avec *S. cerevisiae* dans leur profil de consommation des acides aminés lors de fermentation en moût synthétique contenant un mix d'acides aminés et d'ammonium (Prior *et al.* 2019). En effet, ces deux espèces consomment la totalité de l'azote assimilable entre 18 et 72 h (Prior *et al.* 2019 ; Roca-Mesa *et al.* 2020 ; Su *et al.* 2020). De plus, la lysine, la méthionine, l'aspartate, l'isoleucine sont parmi les premiers consommés par *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans*, pouvant ainsi être des acides aminés sujet à une forte compétition (Prior *et al.* 2019 ; Roca-Mesa *et al.* 2020). Toutefois, l'histidine et le glutamate semblent être consommés dans les derniers chez *T. delbrueckii* tandis que ce sont parmi les premiers consommés chez *S. cerevisiae* et *M. pulcherrima* (Su *et al.* 2020). Tandis que *T. delbrueckii* et *L. thermotolerans* seraient capables d'assimiler au moins en partie la proline, contrairement à *S. cerevisiae* (Prior *et al.* 2019 ; Su *et al.* 2020). Des différences de comportement entre ces levures ont également été observées en présence ou en absence d'ammonium. Par exemple, *L. thermotolerans* ne consomme pas tout l'azote et ne finit pas la fermentation en absence d'ammonium contrairement à *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* qui malgré un ralentissement de la consommation en azote finissent la fermentation.

D'autres espèces de non-*Saccharomyces* montrent en revanche des profils de consommation de l'azote plus contrastés. Par exemple, *M. pulcherrima* et *S. bacillaris* ont une consommation des sources d'azote assimilable assez lente, pouvant même laisser de l'azote résiduel en fin de fermentation (Prior *et al.* 2019 ; Englezos *et al.* 2020 ; Roca-Mesa *et al.* 2020 ; Su *et al.* 2020). Les acides aminés préférentiellement consommés par *M. pulcherrima* sont le glutamate, la glutamine, l'histidine et la phénylalanine. De plus, *M. pulcherrima* priorise, tout comme *S. cerevisiae*, la lysine et la valine et ne consomme que très peu la proline. En revanche, elle ne consomme que la moitié de l'ammonium (Prior *et al.* 2019 ; Harlé *et al.* 2020 ; Roca-Mesa *et al.* 2020 ; Su *et al.* 2020). *S. bacillaris* favorise fortement la consommation de l'azote inorganique à l'azote organique. D'autre part, concernant l'azote organique, il n'y pas de

consensus sur l'ordre de consommation des acides aminés (Gobert *et al.* 2017 ; Englezos *et al.* 2020 ; Roca-Mesa *et al.* 2020). *H. uvarum* semble avoir une consommation en azote assez différente de *S. cerevisiae* (Kemsawasd *et al.* 2015). Elle semble préférer l'azote organique et laisse environ 50% d'ammonium en fin de fermentation. L'isoleucine, la lysine et la leucine semblent être parmi les premiers consommés (Harlé *et al.* 2020 ; Roca-Mesa *et al.* 2020).

Concernant la compétition pour les vitamines, les besoins des différentes espèces restent encore discutés (Evers *et al.* 2021). Il semblerait que *H. uvarum* et *Hanseniaspora viniae* entraînent des capacités fermentaires réduites de *S. cerevisiae* en lien avec une déplétion de thiamine (Bataillon *et al.* 1996 ; Medina *et al.* 2012). Par ailleurs, *H. uvarum* a perdu la voie de biosynthèse de la thiamine, mais peut la transporter (Steenwyk *et al.* 2019 ; Valera *et al.* 2020). Une étude récente a révélé des différences de consommation de vitamines entre *S. bacillaris*, *T. delbrueckii* et *M. pulcherrima* (Evers *et al.* 2023). Le NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) et le NADP (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) étaient les sources préférentielles pour *M. pulcherrima* et *S. bacillaris* respectivement. *T. delbrueckii* montrait le profil de consommation des vitamines (acide nicotinique, acide pantothénique, biotine) le plus similaire à *S. cerevisiae*, malgré des différences notables dans la vitesse de consommation. Seule la biotine semblait être suffisamment consommée pour présenter un risque de compétition avec *S. cerevisiae*. Toutefois, une autre étude observe une compétition entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* pour la thiamine (Roca-Mesa *et al.* 2020).

b. Libération de composés toxiques ou inhibiteurs

Au cours de leur croissance et pendant la fermentation, les levures peuvent libérer différents composés ayant une activité inhibitrice sur les autres espèces présentes. Ainsi, plusieurs mécanismes comme la production d'éthanol, d'acides gras à chaîne moyenne ou d'acétaldéhyde sont avancés comme pouvant influencer la dynamique microbienne (Viegas *et al.* 1989 ; Fleet 2003 ; Ciani et Comitini 2015). Toutefois, hormis pour l'éthanol, peu d'études se sont focalisées sur leur réel impact sur les interactions (Cheraiti *et al.* 2005) ou l'inhibition des non-*Saccharomyces*.

Par ailleurs, les levures sont également capables de produire des composés protéiques actifs contre d'autres espèces. Par exemple, Albergaria *et al.* (2010) ont mis en évidence la production d'un peptide de moins de 10 kD par *S. cerevisiae* CCM1 885 retardant la croissance de *T. delbrueckii* et causant la mort cellulaire de *H. guillermondii* et *L. thermotolerans*. De

même, certaines souches sont aussi associées à la libération de toxines dites “killer”, qui vont induire la mort des cellules sensibles par formation de canaux ioniques ou par interférence avec la réplication de l’ADN (Schmitt et Breinig 2006). La production de protéines “killer” et la sensibilité à ces protéines est un phénotype espèce et souche dépendant, et le spectre d'activité des protéines *killer* peut être plus ou moins large (Yap *et al.* 2000 ; Boynton 2019). Les souches de *S. cerevisiae killer* sont principalement antagonistes d’autres souches de *S. cerevisiae*, tandis que des souches d’autres espèces comme *T. delbrueckii*, *H. uvarum*, *Pichia membranifaciens* ont aussi montré une activité *killer* contre d’autres espèces, notamment contre *Brettanomyces bruxellensis* (Radler *et al.* 1990 ; Marquina *et al.* 2002 ; Villalba *et al.* 2016 ; Mendoza *et al.* 2019). Enfin, *M. pulcherrima* est capable d’inhiber la croissance d'autres non-*Saccharomyces* par un mécanisme de chélation du fer. En effet, cette espèce sécrète de l’acide pulcherriminique capable de chélater le fer (Oro *et al.* 2014 ; Sipiczki 2020).

c. Interactions contact-dépendantes

Des interactions par contact cellules-cellules ont également été mises en évidence, en particulier, il a été observé une inhibition voire une mort cellulaire de non-*Saccharomyces* induite par contact avec *S. cerevisiae* (Englezos *et al.* 2019 ; Petitgonnet *et al.* 2019 ; Luyt *et al.* 2021). L’étude de tels mécanismes d’interaction se fait grâce à des expériences de fermentations en compartiments séparés par une membrane perméable, permettant un partage du milieu sans contact direct des cellules. Nissen *et al.* (2003) ont été les premiers à démontrer l'importance des contacts cellulaires dans l’arrêt de la croissance de *T. delbrueckii* et *L. thermotolerans* en co-culture avec *S. cerevisiae* en milieu YPD modifié. Ils ont plus tard montré l’intervention conjuguée de mécanismes contact-dépendants et de protéines inhibitrices dans l’interaction entre *L. thermotolerans* et *S. cerevisiae* (Kemsawasd *et al.* 2015). De même, Renault *et al.* (2013) ont confirmé que *S. cerevisiae* induit la mort cellulaire de *T. delbrueckii* par contact physique en moût synthétique, mais que la présence de *T. delbrueckii* peut aussi ralentir la croissance de *S. cerevisiae* par communication cellulaire.

Les contacts cellulaires sont également impliqués dans le phénomène de floculation, qui correspond à une agrégation de cellules formant des flocons. Chez *S. cerevisiae*, la floculation implique la famille des gènes *FLO*, qui codent pour des protéines de la paroi cellulaire (Soares 2011). La floculation a également été montrée chez d’autres espèces: *H. uvarum*, *H. opuntiae*, *T. delbrueckii*, *Metschnikowia fructicola*, *Pichia kudriavzevii*, *Cryptococcus flavescens*

(Martínez *et al.* 1995 ; Rossouw *et al.* 2015 ; Guaragnella *et al.* 2019) et la possibilité de former des floccs mixtes, comportant des cellules de *S. cerevisiae* et *H. uvarum* par exemple (Rossouw *et al.* 2015). Par ailleurs, les gènes *FLO* seraient impliqués dans les interactions entre plusieurs espèces. En effet, la surexpression des gènes *FLO1*, *FLO5* ou *FLO11* chez *S. cerevisiae* impacte la viabilité et la dynamique de population de consortia de 3 et 4 espèces de levures œnologiques (Rossouw *et al.* 2018). De plus, la protéine Flo11p semble associée à une plus forte affinité envers elle-même, ce qui pourrait être impliqué dans un mécanisme de reconnaissance des paires (Brückner *et al.* 2020).

D'un point de vue plus global, il est plus que probable qu'en conditions réelles, différents mécanismes d'interactions interviennent simultanément, expliquant en partie la complexité à prédire exactement la dynamique microbienne durant la fermentation (**Figure 9**).

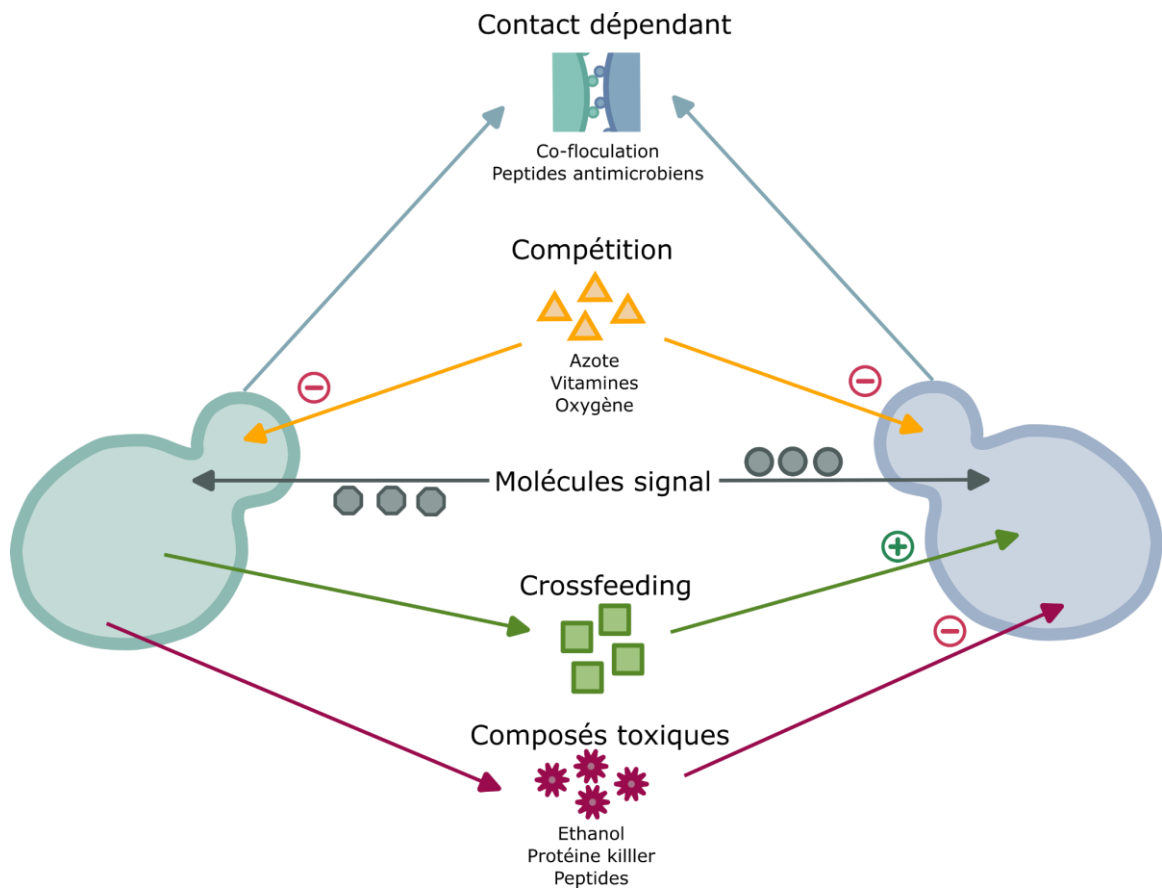


Figure 9 : Schéma des différents mécanismes d'interaction identifiés entre levures (adapté de Ciani et Comitini 2015 et Conacher *et al.* 2019).

3. Communautés synthétiques

a. Définitions

Les écosystèmes microbiens naturels sont généralement très complexes et peuvent comprendre plusieurs centaines d'espèces comme dans le cas des microbiote gastro-intestinal (Hollister *et al.* 2014), voire plusieurs milliers d'espèces pour le microbiote du sol (Curtis et Sloan 2004). De plus, les communautés naturelles se structurent dans l'espace et dans le temps, associant des microenvironnements à des diversité et dynamiques microbiennes différentes (Stubbendieck *et al.* 2016). Une **communauté modèle** est composée d'un nombre réduit d'espèces représentatives d'une communauté naturelle (De Roy *et al.* 2014 ; Großkopf et Soyer 2014 ; Blasche *et al.* 2017). Elle constitue ainsi un intermédiaire entre la complexité d'une communauté naturelle et la résolution analytique permise par les mono-cultures. Cela assure également le contrôle des conditions environnementales, ce qui permet à la fois une standardisation, ainsi que l'étude de l'impact de chaque facteur environnemental sur la communauté (De Roy *et al.* 2014 ; Sun et Sanchez 2023).

Blasche *et al.* (2017) définit plusieurs critères à considérer lors du développement de communautés modèles. Le premier critère est la **représentativité** de la communauté modèle par rapport à la communauté naturelle. Récemment, Toju *et al.* (2020) ont proposé un cadre pour déterminer des ensembles de micro-organismes centraux de communauté microbienne, à la fois d'un point de vue de leur importance dans la structuration de la communauté, mais également de leur importance fonctionnelle au sein de la communauté. Il est aussi possible d'adopter une stratégie "top-down" en enrichissant des communautés naturelles ou à partir de réduction de diversité pour obtenir des microcosmes (Foster et Bell 2012).

Il faut ensuite s'assurer de l'**accessibilité** des différents micro-organismes, c'est-à-dire de la facilité d'utiliser chaque micro-organisme. En effet, de nombreux micro-organismes ne sont pas "cultivables" dans les conditions de laboratoire actuelles (Vrancken *et al.* 2019), bien que les progrès techniques permettent aujourd'hui de tester des conditions de cultures plus complexes (Stewart 2012). Cela peut donc limiter l'inclusion de certaines espèces dans des communautés modèles.

Un soin important doit aussi être apporté pour s'assurer de la **stabilité** de la communauté, et de sa **reproductibilité**.

Plusieurs définitions existent pour le terme de **communauté synthétique**, pouvant désigner des communautés de micro-organismes qui ne se trouvent pas ensemble dans la nature (Bengtsson-Palme 2020) ou encore des communautés de micro-organismes génétiquement modifiés, notamment pour forcer certaines interactions (Xavier 2011). Ici, les termes de communauté synthétique et consortia seront utilisés dans un sens large désignant l'ensemble des communautés construites artificiellement, peu importe qu'elles se basent sur une communauté naturelle ou qu'elles incluent des espèces génétiquement modifiées (Großkopf et Soyer 2014).

b. Applications des communautés synthétiques

Les communautés synthétiques de micro-organismes ont un large champ d'applications, allant des bioprocédés à l'étude de théories écologiques (De Roy *et al.* 2014 ; Bengtsson-Palme 2020).

L'utilisation de co-cultures et de communautés synthétiques en biotechnologie est basée sur l'idée de division du travail, comme observée dans certaines communautés naturelles réalisant des fonctions complexes (Shong *et al.* 2012 ; Minty *et al.* 2013). Ainsi, certains consortia sont construits pour réaliser une fonction en utilisant les activités de plusieurs micro-organismes. Minty *et al.* (2013) ont par exemple montré qu'il était possible de produire de l'isobutanol à partir de lignocellulose par l'action conjointe d'un champignon ayant une forte activité cellulolytique et d'une bactérie *Escherichia coli* génétiquement modifiée. La production de vitamine C est un autre exemple de l'intérêt de l'utilisation de communautés synthétiques pour les bioprocédés. En effet, elle peut être produite à partir de sorbitol lors d'une fermentation en 2 étapes, dont la deuxième est une co-culture de *Ketogulonicigenium vulgare* avec *Bacillus megaterium*. En plus de présenter une division du travail entre les différentes bactéries, il a été montré que la co-culture permet d'obtenir des rendements plus importants qu'en mono-cultures notamment en lien avec des mécanismes de cross-feeding (Ma *et al.* 2011 ; Zhang et Lyu 2022). Des rendements plus importants en co-culture ont également été reportés pour la production d'acide muconique, molécule utilisée pour la synthèse de polymères, à partir de co-culture de deux souches de *E. coli* modifiées génétiquement. L'utilisation des deux souches permettait d'éviter l'accumulation d'un intermédiaire observé quand toute la voie métabolique était combinée dans une seule souche (Zhang *et al.* 2015).

En outre, le développement d'outil de prédiction, à partir de données génomiques et métaboliques, permet d'optimiser et de réduire le nombre de combinaisons à tester pour réaliser une fonction d'intérêt (Canon *et al.* 2020 ; Toju *et al.* 2020). En parallèle, les outils microfluidiques ont la capacité de tester un nombre croissant de combinaisons, facilitant les étapes de screening (Kehe *et al.* 2019).

D'autres part, les communautés synthétiques peuvent servir de modèle pour comprendre les bases des interactions en communautés, et permettre d'avoir un aperçu des mécanismes possiblement impliqués dans les communautés naturelles. Par exemple, il a été montré que des communautés stables pouvaient être établies à partir de mutants de *E. coli* exprimant chacune une auxotrophie différente (Mee *et al.* 2014). D'autre part, les communautés synthétiques permettent d'explorer l'impact de l'environnement sur les interactions. Ainsi, il a été montré que des conditions combinées de toxicité importante et de faibles concentrations en nutriments pouvaient favoriser des interactions positives entre quatre bactéries issues d'effluents d'eau (Piccardi *et al.* 2019). Concernant le microbiote gastro-intestinal, plusieurs communautés modèles ont été développées, notamment pour tester l'influence du régime alimentaire ou le devenir de xénobiotiques dans l'organisme (Venema et van den Abbeele 2013). Un effort particulier a aussi été mené pour la modélisation de communautés complexes afin de prédire leur dynamique microbienne. L'étude de co-cultures à deux et trois espèces a notamment été utilisée pour prédire la croissance des différentes espèces d'une communauté de huit bactéries du sol (Friedman *et al.* 2017) ou encore d'une communauté modèle de douze espèces trouvées dans le tractus gastro-intestinal (Venturelli *et al.* 2018).

c. Exemples des communautés modèles en œnologie

Le développement de consortia modèles est facilité dans le cas des produits fermentaires puisque ceux-ci présentent un nombre d'espèces relativement restreint comparé à d'autres communautés naturelles (Blasche *et al.* 2017). De plus, la plupart de ces micro-organismes sont facilement isolables et cultivables en laboratoire permettant une manipulation plus aisée (Wolfe *et al.* 2014 ; Boynton et Greig 2016). Les dynamiques de population se mettant en place lors des fermentations sont de plus en plus connues pour de nombreux produits mais le mécanisme des interactions et l'influence des facteurs environnementaux affectant cette dynamique restent une énigme à résoudre que la

modélisation pourrait aider à comprendre (Alekseeva *et al.* 2021). Dans le milieu œnologique, plusieurs exemples de consortia synthétiques ont été décrits.

En co-inoculant deux souches de *S. cerevisiae* avec un consortium de cinq NS, Albertin *et al.* ont montré que la présence de NS peut réduire la phase de latence d'une souche de *S. cerevisiae* ayant un temps de latence long mais pas de la souche ayant un temps de latence court. Cette différence serait principalement due à la présence de *S. bacillaris* dans le consortium (Albertin *et al.* 2017). Toutefois, cette étude ne permettait pas le suivi de la dynamique individuelle de chaque espèce. Au contraire, (Bagheri *et al.* 2017) ont développé un consortium composé de 8 espèces isolées de moût où chaque espèce était quantifiée via un suivi ARISA. En utilisant ce consortium, les auteurs ont pu mettre en évidence l'impact de facteurs abiotiques comme la température et la concentration en SO₂ ainsi que de facteurs biotiques (présence ou non de *S. cerevisiae* ou du microbiote indigène) sur la dynamique des levures lors de la fermentation (Bagheri *et al.* 2020). L'impact de différents stress rencontrés en conditions œnologiques peut également induire des changements de population à l'échelle de la seule espèce de *S. cerevisiae*. L'obtention de ces résultats a été permise par la construction d'un consortium d'environ 80 souches de *S. cerevisiae*, chaque souche étant modifiée génétiquement pour contenir une séquence "code-barres" (Schmidt *et al.* 2020).

Cependant, les méthodes de suivi par biologie moléculaire nécessitent souvent des étapes d'extraction et de séquençage qui peuvent rendre laborieux l'obtention des résultats de dynamique de population pendant la fermentation. Ainsi, en utilisant une stratégie de marquage avec des protéines fluorescentes, des communautés de trois et quatre membres de levures ont pu être suivies pendant la fermentation par cytométrie en flux (Conacher *et al.* 2020). A l'aide de ces communautés, Conacher *et al.* (2021) ont par exemple montré que les conditions de précultures peuvent modifier la dynamique lors de la fermentation, par exemple les différentes NS montrent des temps de latence plus variables après une propagation en YPD puis en moût synthétique qu'après une simple propagation en YPD. Cette communauté a également permis la mise en évidence des interactions d'ordre supérieur, soulignées chez *S. cerevisiae* par l'expression de gènes spécifiquement lorsqu'elle est en co-cultures avec *T. delbrueckii* et *L. thermotolerans* (Conacher *et al.* 2022).

V. Objectifs

Ce travail de thèse s'inscrit donc dans un effort de compréhension des dynamiques des communautés levuriennes dans un contexte de fermentation œnologique. **L'objectif principal était de construire une communauté modèle simplifiée de levures**, qui soit représentatif de la diversité des levures dans le moût de raisin et qui permette de dénombrer individuellement chaque espèce.

La première partie de ce travail s'est focalisée sur la stratégie de construction du consortium. La stratégie de suivi choisie se basait sur l'utilisation de différent fluorochrome pour distinguer les espèces pendant la fermentation par cytométrie en flux, de manière similaire à la stratégie développée par Conacher et al. (2020). La première étape a été la **mise au point d'outils moléculaires pour la transformation des levures, notamment pour les espèces non-*Saccharomyces***. Ceci a permis de marquer les différentes espèces avec différents gènes de fluorescence intégrés au génome et exprimés tout au long de la fermentation.

Dans un second temps, nous avons souhaité **étudier l'importance relative des niveaux taxonomiques de la souche et de l'espèce dans les interactions par paires**. Pour cela, des co-cultures avec trois souches de cinq espèces de levures différentes ont été testées pour comparer la croissance en absence et en présence d'interaction.

L'étude de l'effet relatif des souches a ensuite été complétée par une expérience visant à **évaluer comment l'utilisation de différentes souches dans un consortium peut influencer la conduite de la fermentation**. Ainsi, des fermentations en consortia de sept espèces utilisant des combinaisons de souches différentes ont été réalisées. La composition en espèce et l'abondance relative de chaque espèce étaient les mêmes dans tous les consortia, et ont été déterminées à partir de données bibliographiques afin de s'approcher au mieux de ce qui est rencontré en conditions réelles. Les sept espèces choisies étaient parmi les plus fréquemment isolées dans le moût et pendant la fermentation : *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *S. bacillaris*, *M. pulcherrima*, *P. kudriavzevii*, *L. thermotolerans* et *T. delbrueckii*. La performance des consortia a été évaluée par la cinétique fermentaire (suivi de pertes de CO₂), la dynamique de *S. cerevisiae* et la production de métabolites issues du métabolisme carboné central.

Dans une dernière partie, nous avons voulu **tester l'hypothèse d'un lien entre diversité de la communauté et fonctionnalité en condition de stress**. Ainsi, l'effet de différents niveaux de diversité α (modulé par des variations d'équitabilité à l'inoculation) sur la performance de

consortia en condition de stress osmotique. Cette expérience a pu souligner la possibilité d'utiliser la communauté modèle de levures développée dans ce travail pour explorer des questions d'écologie microbienne.

Chapitre 1 :

**Comparaison de la hiérarchie des
interactions inter- et intraspécifiques
en co-culture**

L'étude des interactions entre les souches de levures est essentielle pour comprendre leur impact sur le processus de fermentation et la qualité du vin. Dans ce premier chapitre de thèse, nous nous sommes plus spécifiquement demandé si les mécanismes d'interaction étaient déterminés au niveau de l'espèce ou de la souche.

Pour ce faire, nous avons testé toutes les combinaisons entre 15 souches issues de 5 des espèces (3 souches par espèces) les plus communes dans le moût : *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *S. bacillaris* et *T. delbrueckii*, et *S. cerevisiae*. En utilisant ce système simplifié, nous avons quantifié la croissance totale des levures de toutes les co-cultures et monocultures en moût synthétique, dont la composition est donnée en annexe (Annexes 1 à 6). En comparant le niveau des interactions intraspécifique et interspécifique, nous avons évalué quel était le niveau taxonomique le plus pertinent pour prédire les interactions levure-levure.

Nos résultats ont montré une détermination du type d'interaction (positives ou négatives) principalement au niveau de l'espèce, tandis que le niveau de la souche déterminait des variations d'intensité des interactions. De plus, cette première partie a permis un apport grâce au développement de souches, notamment d'espèces non-*Saccharomyces* génétiquement modifiées pour exprimer une protéine fluorescente.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal FEMS Yeast Research, sous la référence « Pourcelot E., Conacher C., Marlin T., Bauer F., Galeote V. et Nidelet T., 2023 « **Comparing the hierarchy of inter-and intra-species interactions with population dynamics of wine yeast cocultures** », FEMS Yeast Research : foad039. »

Comparing the hierarchy of inter- and intra-species interactions with population dynamics of wine yeast cocultures

Eléonore Pourcelot¹, Cleo Conacher^{2,3}, Thérèse Marlin¹, Florian Bauer², Virginie Galeote¹, Thibault Nidelet^{1*}

¹SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, 34060 Montpellier, France

²Department of Viticulture and Oenology, South African Grape and Wine Research Institute, Stellenbosch University, Stellenbosch, 7602, South Africa

³Department of Information Science, Centre for Artificial Intelligence Research, Stellenbosch, 7602, South Africa

*Corresponding author. SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, 2, Place Pierre Viala, 34060 Montpellier, France. E-mail: thibault.nidelet@inrae.fr

Editor: [Isak Pretorius]

Abstract

In winemaking, the development of new fermentation strategies, such as the use of mixed starter cultures with *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) yeast and non-*Saccharomyces* (NS) species, requires a better understanding of how yeasts interact, especially at the beginning of fermentation. Despite the growing knowledge on interactions between Sc and NS, few data are available on the interactions between different species of NS. It is furthermore still unclear whether interactions are primarily driven by generic differences between yeast species or whether individual strains are the evolutionarily relevant unit for biotic interactions. This study aimed at acquiring knowledge of the relevance of species and strain in the population dynamics of cocultures between five yeast species: *Hanseniaspora uvarum*, *Lachancea thermotolerans*, *Starmerella bacillaris*, *Torulaspora delbrueckii* and Sc. We performed cocultures between 15 strains in synthetic grape must and monitored growth in microplates. Both positive and negative interactions were identified. Based on an interaction index, our results showed that the population dynamics seemed mainly driven by the two species involved. Strain level was more relevant in modulating the strength of the interactions. This study provides fundamental insights into the microbial dynamics in early fermentation and contribute to the understanding of more complex consortia encompassing multiple yeasts strains.

Keywords: microbial interactions, non-*Saccharomyces*, genetic modification, diversity

Introduction

Wine is the result of the fermentation of grape must by a variety of microorganisms. Wine yeast species show a great diversity, especially at the beginning of fermentation, including species belonging to the genera *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Aureobasidium* (yeast-like), *Pichia*, *Starmerella*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Rhodotorula*, and others (Fleet 2003, 2007; Drumonde-Neves et al. 2021). *Saccharomyces cerevisiae*, if detected, is only present at relatively low cell densities in the initial must, but increases during fermentation and is the main species responsible for the completion of the fermentation. Indeed, non-*Saccharomyces* (NS) yeasts, sometimes after an initial rapid growth, tend to decrease during the latter stages of fermentation. This decrease has been attributed to several abiotic factors such as decrease in oxygen, increase in toxic metabolites, including ethanol. More recently biotic factors related to competitive interaction with other species have been highlighted as significant causes for these changes (Fleet 2003). During winemaking, must is often inoculated with *S. cerevisiae* to ensure completion of the fermentation process, however, this is associated with standardization of the final product (Ciani et al. 2010). Thus, there is an increasing interest in introducing non-*Saccharomyces* (NS) to improve the quality of the product and meet consumers' expectations related to more natural products (Galati et al. 2019). Indeed, NS secrete a broader spectrum of enzymes that might release aroma precursors from grapes and have diverse metabolic pathways that allow for variable produc-

tion of secondary metabolites (Jolly et al. 2006; Polizzotto et al. 2016; Varela and Borneman 2017). However, most of the time, NS alone are not able to ferment to dryness, which has led to the development of mixed starters including *S. cerevisiae* with NS such as *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia fructicola*, *Lachancea thermotolerans* (Binati et al. 2020). Several NS starters are already available on the market, which are advertised to increase wine aroma complexity, reduce ethanol, or have bioprotection properties to name a few (Roudil et al. 2020). For instance, Renault et al. (2015) showed that co-inoculation of *S. cerevisiae* with *T. delbrueckii* increases the acetate ester content. *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima* are also used for bioprotection (Simonin et al. 2018; Sipiczki 2020). *Lachancea thermotolerans* is mainly investigated for its potential for lactic acid production (Morata et al. 2018) and *Starmerella bacillaris* is related to increased glycerol production, which improves mouthfeel (Englezos et al. 2017; Binati et al. 2020). Cocultures of *S. cerevisiae* with *Hanseniaspora uvarum* were related to overyielding of glycerol indicating positive interactions for this functional trait (Harlé et al. 2020).

However, there is limited understanding of how desirable properties emerge from application of multispecies starters, especially regarding the contribution of yeast-yeast interactions. Therefore, to manage fermentations using mixed starters, we need to better understand yeast interactions that might influence the process and final product. Interactions between yeasts can be positive, neutral or negative. Besides the deleterious effect of toxic

Received 25 July 2023; accepted 31 August 2023

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of FEMS. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

compounds such as ethanol produced during fermentation, several mechanisms might explain yeast interactions in must (Ciani et al. 2016, Rossouw et al. 2018, Conacher et al. 2019, Bordet et al. 2020). For instance, some *S. cerevisiae* strains, as well as various other yeast species, can produce killer toxins, inhibiting cells either from other species or from the same species (Boynton 2019). *S. cerevisiae* also seems to induce cell death of *L. thermotolerans* and *S. bacillaris* through contact dependent interactions (Englezos et al. 2017, Petitgonnet et al. 2019, Luyt et al. 2021). Rossouw et al. (2015, 2018) also showed that changes in adhesion properties of *S. cerevisiae* significantly affected the survival of other species. Presence of other yeast species have also been found to cause changes in gene expression, for instance *S. cerevisiae* tends to promote genes related to glycolysis and aerobic respiration when in presence of *T. delbrueckii* or *M. pulcherrima* (Tronchoni et al. 2017, Mencher et al. 2021), which might increase its nutrient uptake. Then, the different yeast species could also have overlapping nutritional requirements leading to competition for nutrients such as amino-acids or vitamins (Rollero et al. 2018, Evers et al. 2021). The evidence suggests that there are indeed species-specific yeast-yeast interactions. However, the strain choice could also be an important parameter. Indeed, besides interspecific species diversity, yeasts also show a great intraspecific genetic diversity driven by geographic origin [e.g. *S. bacillaris* (Masneuf-Pomarede et al. 2015)] or the technological origin [e.g. *S. cerevisiae* or *L. thermotolerans* (Legras et al. 2007, Hranilovic et al. 2017)]. This genetic diversity is also associated with phenotypic variability between strains isolated from different environments. For instance, *S. cerevisiae* strains from different environments showed different fermentation performances (Camarasa et al. 2011) and competitive abilities (Pérez-Torrado et al. 2018). Even isolates from winery environments display variability in their phenotypic properties such as ethanol resistance, β -glucosidase activity, hydrogen sulphide production, and lactate production (Hranilovic et al. 2017, Morata et al. 2018, Silva-Sousa et al. 2022). This intraspecific diversity may cause variability in chemical composition of fermentation both in monoculture (Bordet et al. 2021) and in coculture (Wang et al. 2016) and therefore impact yeast-yeast interactions and ultimately, the final wine product.

However, it is still unclear which taxonomic level most influences the nature of microbial interactions, or, in other words, is it important to study strain-strain interactions, or, are interaction mechanisms generalized at the species-species level? This gap in understanding can largely be attributed to challenges in differentiating different strains of microorganisms in nature, since most known methodologies used in survey studies cannot distinguish different strains. Thus, the aim of this study was to investigate in simplified systems the determining level of interaction in five yeast species: *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *S. bacillaris*, and *T. delbrueckii*, and *S. cerevisiae*. To achieve this, a flow cytometric methodology was developed to distinguish different strains of yeast within mixed cultures, and a high-throughput methodology was used to quantify the population dynamics of all possible pairwise cocultures between 15 strains including 3 strains for the 5 species. This study has applied a versatile methodology for inter-strain interactions and has contributed to the understanding of taxonomic influence on yeast-yeast interactions, using wine yeast as a model.

Methods

Strains and medium

In this study, five wine yeast species were used: *Saccharomyces cerevisiae* and four non-*Saccharomyces* (NS): *Hanseniaspora*

uvarum, *Lachancea thermotolerans*, *Starmerella bacillaris*, and *Torulaspora delbrueckii*. For each species, three strains were included, all isolated from wine-related environments. All the 15 strains were fluorescently tagged by integrating a fluorescent protein gene into the genome to ensure a better stability of the signal. Origin of each strain can be found in Table 1. Strains were kept at -80°C in yeast peptone dextrose YPD (Peptone; 20 g/L, Glucose 20 g/L; Yeast extract 10 g/L—Sigma-Aldrich, Johannesburg, South Africa) supplemented with 20% of glycerol before being streaked on Wallerstein (WL) nutrient agar (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany).

Eight *Escherichia coli* DH5 α strains (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) carrying plasmids were used for cassette amplification and were propagated in LB broth (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ampicillin (Sigma-Aldrich).

The high-throughput microplate growth assay were performed using synthetic grape must (SGM425) prepared according to Bely et al. (1990), with 100 g/L of glucose, 100 g/L of fructose and 425 mg/L of yeast assimilable nitrogen (as a mix of ammonium chloride and amino acids).

Generation of fluorescently tagged yeast strains

For the yeast strains transformed in this study, EGFP (enhanced green fluorescent protein) was integrated into the genome in fusion to *TDH3* gene (or its orthologue in non-*Saccharomyces* species) using homologous recombination. In *S. cerevisiae*, *TDH3* promoter is a strong promoter known to be expressed throughout fermentation. Cassettes containing the fluorescent protein and an antibiotic selection marker were amplified from different plasmids listed in Supplementary Table 1.

Plasmid construction

Plasmids containing the EGFP and different antibiotic resistance gene or specific homology regions were constructed by Gibson assembly (Gibson et al. 2009) using the NEB Builder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs) and transformed into *Escherichia coli* DH5 α (New England Biolabs) following the manufacturer instructions. EGFP in the pFA6 backbone as well as antibiotic resistance genes were obtained from plasmids ordered from AddGene (#44 900, #44 645, Table S1) (Sheff and Thorn 2004, Lee et al. 2013). Where necessary, homologous sequences of approximately 1 kb were amplified from the target species (*T. delbrueckii* CLIB3069, *H. uvarum* CLIB3221, *S. bacillaris* CLIB3147). All plasmids were checked by enzymatic digestion (New England Biolabs). A list of the primers and templates used for the amplification of the different Gibson fragments can be found in Supplementary Table 2.

Plasmid DNA was extracted from 3 mL of overnight *E. coli* LB culture with the NucleoSpin Plasmid extraction kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) according to manufacturer instructions. Cassettes used for transformation were amplified with a high fidelity enzyme, either the KAPA HiFi kit (Cape Town, South Africa) or Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania), using primers specific to each species, as listed in Supplementary Table 3.

Lithium acetate transformation

Cells were transformed according to Güldener et al. (1996) with some modifications. Fifty milliliters of fresh culture grown in YPD to $\text{OD}_{600} = 2$ were centrifuged at 4415 g for 5 min. Pellets were washed with 20 mL of Tris 10 mM, pH 7.5 and suspended in 25 mL of lithium acetate 0.1 M in Tris-HCl 10 mM, pH 7.5. Cells were incubated for 40 min at room temperature under gentle shaking. After incubation, cells were pelleted at 430 g for 5 min and suspended in 1,125 mL of lithium acetate 0.1 M in Tris-HCl 10 mM,

Table 1. List of yeast strains used in this study.

Species	Strain name	Designation	Genotype	Origin	Reference/Provider
<i>S. cerevisiae</i>	M2ONO800_1A	Sc1152		France	Marsit et al. 2015
	M2ONO800_1A G2		TDH3-GFP KANMX		This study
	59A	Sc59A	MATa ho AMN1::kanMX4	France	Ambroset et al. 2011
	59A GFP		MATa ho AMN1::TEF2Pr-GFP-ADH1-NATMX4		Marsit et al. 2015
<i>H. uvarum</i>	VIN13	ScVIN13		South Africa	SAWGRI
	VIN13 mCherry		TDH3-MCHERRY KANMX		Conacher et al. 2020
	CLIB3218	Hu3218		France	CIRM
	CLIB3218 G2		TDH2-GFP KANMX		This study
	CLIB3221	Hu3221		France	CIRM
<i>L. thermotolerans</i>	CLIB3221 G5		TDH2-GFP KANMX		This study
	CLIB3118	Hu3118		France	CIRM
	CLIB3118 G2		TDH2-GFP KANMX		This study
	CLIB3053	Lt3053		France	CIRM
	CLIB 3053 G6		KLTH0G15730-GFP NATMX		This study
	PY V7-21	LtV7-21		France	SPO, unpublished
	PY V7-21 G5		KLTH0G15730-GFP NATMX		This study
<i>T. delbrueckii</i>	Y1240	LtY1240		South Africa	SAWGRI
	Y1240 BFP		KLTH0G15730-GFP NATMX		Conacher et al. 2020
	CLIB3069	Td3069		France	CIRM
	CLIB3069 G2		TDELOE04750-GFP NATMX		This study
	CLIB3337	Td3337		France	CIRM
	CLIB3337 G1		TDELOE04750-GFP NATMX		This study
<i>S. bacillaris</i>	LO544	TdLO544		France	CRBO
	LO544 GFP		TDELOE04750-GFP NATMX		Conacher et al. 2020
	CLIB3147	Sb3147		France	CIRM
	CLIB3147 G1		TDH3-GFP HPHMX		This study
	CLIB3334	Sb3334		France	CIRM
	CLIB3334 G3		TDH3-GFP HPHMX		This study
	PY V8-1	SbV8-1		France	CIRM
	PY V8-1 G1		TDH3-GFP HPHMX		This study

pH 7.5. One hundred microliters of cells were incubated at room temperature with 10 μ L of single stranded DNA carrier (Sigma) and 4 μ g of PCR fragment for 10 min. Cells were supplemented with 300 μ L of PEG 50% in lithium acetate 0.1 M and incubated again at room temperature for 10 min. Cells were then incubated at 42°C for 15 min. After centrifugation at 430 g for 5 min, supernatant was discarded and replaced with 500 μ L of YPD. Cells were allowed to recover overnight, then centrifuged at 430 g for 5 min and suspended in 1 mL of Tris 10 mM, pH 7.5 before being plated and incubated for one week at 28°C.

Electroporation

The protocol used for the transformation of cells by electroporation was adapted from Gordon et al. (2019). Briefly, cells were inoculated at $OD_{600} = 0.5$ in 50 mL YPD and grown to $OD_{600} = 2$. Cells were pelleted by centrifugation at 4415 g for 5 min and rinsed in 25 mL of water. Incubation in 0.1 M LiOAc in 1X TE and DTT 1 M were done according to Gordon et al. 2019. At the final preparation step, cells were suspended in 1 mL of 1 M sorbitol instead of 250 μ L. Electro-competent cells were stored at -80°C . Before electroporation, cells were thawed at room temperature, then centrifuged for 5 min at 430 g. Supernatant was replaced by fresh sorbitol 1 M and cells were kept on ice. Eighty microliters of cells were electroporated at 1.5 kV, 600 Ω , and 10 μ F in 0.2 mm cuvettes using Epporator electropotator (Eppendorf, Hamburg, Germany). After electroporation, 1 mL of YPD/sorbitol mix (50:50) was immediately added to the cells. Cells were transferred to test tubes and incubated overnight at 28°C without shaking. Cells were plated onto YPD supplemented with antibiotics and allowed to grow at 28°C for one week.

Clone selection and constructions control

For each yeast strain transformation, 8 clones were selected and streaked on fresh YPD supplemented with antibiotic. *S. cerevisiae* and *H. uvarum* transformants were selected on YPD supplemented with 200 μ g/mL of G418 (Sigma-Aldrich), *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* transformants were selected on YPD supplemented with 100 μ g/mL of nourseothricin (Jena Bioscience, Jena, Germany), *S. bacillaris* transformants were selected on YPD supplemented with 800 μ g/mL of hygromycin (Sigma). The correct integration of the cassette at the TDH3 locus was verified with two PCR using primers outside the integration site and in the cassette. A list of primers used for verification PCR can be found in [Supplementary Table 4](#). Fluorescence was observed by fluorescent microscopy and flow cytometry. Growth of selected clones was compared to WT in YPD and SGM425 to ensure genetic modification did not influence strain behaviour.

Microplate growth

A single colony picked from a WL agar plate was propagated in 5 mL YPD for 17 hours at 25°C with shaking at 40 rpm. Then, 100 μ L of this preculture was propagated in 5 mL SGM425 for 24 hours at 25°C with shaking at 40 rpm. One mL of culture was harvested, centrifuged, and washed in physiological saline (3000 g—5 min). Cell density and fluorescence of all cells in the culture were measured by cytometry and appropriate volume of culture was used to inoculate SGM425 at 10^6 cells/mL. Microplates were prepared by mixing 100 μ L of SGM425 cell suspension of two strains in each well, as shown on the schematic plan in Fig. 1. Monocultures were inoculated with both the WT strain and its fluorescently tagged counterpart, while cocultures were inoculated

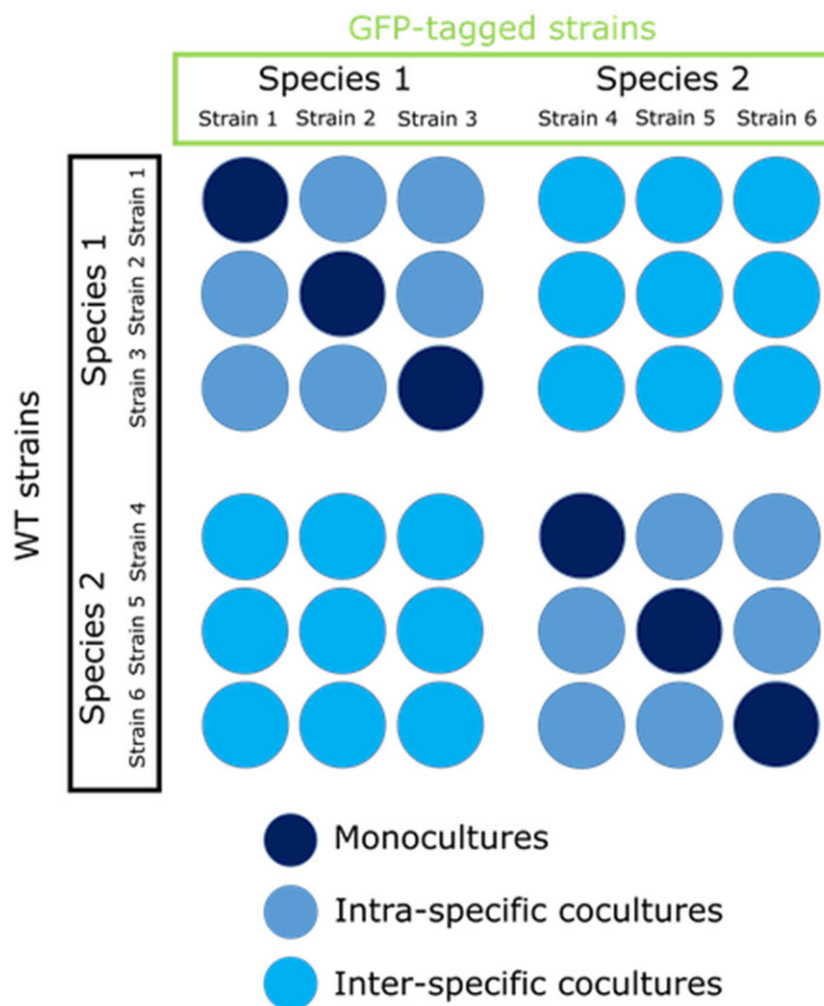


Figure 1. Experimental layout of the mono- and coculture microplate cultures.

with a WT strain and a different fluorescently tagged strain. Plates were covered with a transparent polystyrene lid before being incubated at 28°C for 24 hours with 600 rpm shaking in the Nico plate reader. OD₆₀₀ was measured every 30 min. Despite testing for direct fluorescence reading in microplates, we were unable to measure accurately fluorescence during growth, probably related to media interference. Each coculture was done in biological quadruplicate and monocultures in biological triplicate in at least two independent runs. Initial and final populations of each strain was measured with Cytoflex flow cytometer (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) and fold change was calculated by divided final abundance by the initial abundance. Samples were diluted to include less than 1000 events per second, and acquisition was stopped at 10 000 events. GFP events were detected using the FITC-A channel ($\lambda_{ex}=488$ nm, filter = 525/40BP), mCherry events with the ECD-A channel ($\lambda_{ex}=488$ nm, filter = 610/20 BP) and BFP events were detected with the PB450-A channel ($\lambda_{ex}=405$ nm, filter = 450/45BP). Three different fluorescent channel were used since the study included strains with different fluorescent proteins used in consortia as reported in Conacher et al. (2020).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software, version 4.2.2 (R Core Team 2022). To obtain the growth rate and area under the curve (AUC) growth parameters, growth curves from the plate

reader were analysed with the growthcurver package based on a logistic model (Sprouffske and Wagner 2016). To assess the species and strain effect on growth in monocultures, mixed model analysis were applied to the growth parameters values using the following model:

$$Y_i = \alpha + \beta \text{Species}_i + b_i \text{Strain}_i + \epsilon_i$$

α = intercept, Y_i : growth parameter, $\beta \text{Species}_i$ fixed term related to species, $b_i \text{Strain}_i$ term related to the strain effect, since species and strains constitute hierarchical variables. The model was tested with the *lmer* function (*lmerTest* package, Kuznetsova et al. 2017). For the growth rate, AUC and maximum population in monocultures, since we observed a strong species effect, differences between strains were tested for each species by ANOVA using the *agricolae* package (Mendiburu and Yaseen 2020). For the latency, no species effect was observed thus all 15 strains were compared by ANOVA. For cocultures, an interaction index was calculated using the values of both monocultures using the following formula applied to the AUC example:

$$\text{Interaction index for AUC} = \frac{AUC_{\text{coculture}} - \frac{AUC_{S1} + AUC_{S2}}{2}}{\frac{AUC_{S1} + AUC_{S2}}{2}}$$

$AUC_{\text{coculture}}$ is the value of the AUC for the coculture of strain S1 and S2, AUC_{S1} and AUC_{S2} are the value of the AUC for the

monocultures of strain of S1 and strain S2 respectively. Clustering analyses on the interaction index were performed using the `hclust` function from the `stats` (R Core Team 2022) package and clusters were verified by bootstrapping done with `clusterboot` package (using 'subset' and 'complete' method, on 1000 bootstrap iteration) function from the `fpc` package (Hennig 2010). Heatmaps were built following the clustering and interaction index with the `ComplexHeatmap` package (Gu 2022).

Results

In this work, we studied the population dynamics in cocultures between 15 different strains from five yeast species: *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachancea thermotolerans*, *Torulaspora delbrueckii*, *Starmerella bacillaris*, and *Hanseniopsis uvarum*. For this purpose, we first generated all strains with a fluorescent tag to measure the population relative abundance of each strain in the cocultures. We then tested all monocultures (coculture consisting of the wild-type strain and its genetically modified counterpart, which carries a fluorescent protein) and pairwise cocultures in synthetic must, following the OD₆₀₀ in microplates (Fig. 1) to enable testing numerous combinations.

Construction of fluorescently tagged strains

We successfully managed to integrate the cassette containing the EGFP gene at the locus in the five species we studied. However, protocol has been adapted for each species, which should inform future applicability of this methodology for other target non-conventional yeast. For example, LiAc transformation method did not result in transformants for *L. thermotolerans*. Thus, only *S. cerevisiae* was transformed with the LiAc method, whereas electroporation method was applied for all the non-*Saccharomyces* (NS) strains since it is reported to be more effective (Lin-Cereghino et al. 2005, Gordon et al. 2019). Concerning the homologous recombination, in *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans*, short homology arms (60 bp) flanking the cassette were sufficient to obtain transformants with the cassette integrated at the locus. Therefore, for *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans*, cassettes were amplified from non-specific plasmids using primers containing overhang with homologous sequence to the target integration site (stop codon of the TDH3 gene) of 60 bp (Table S3). However, for *T. delbrueckii* as well as *H. uvarum*, short homologous sequences were not sufficient to obtain targeted integration, which may be explained by a predominance of the non-homologous-end-joining (NHEJ) DNA repair mechanism in some species (Cai et al. 2019, Navarrete and L. Martínez 2020). Consequently, we used homologous sequences of 1 kb upstream and downstream the target integration site to promote homologous recombination for *T. delbrueckii*, *H. uvarum* and *S. bacillaris* (Nambu-Nishida et al. 2017, Badura et al. 2021). This required the construction of specific plasmid containing the homologous sequences flanking the cassette with the EGFP and antibiotic resistance genes (Table S1). Every coculture, as well as monoculture, was then constituted of one tagged strain (or clone for monoculture) with one untagged strain (or clone) to enable their discrimination.

Inter- and intra-specific variability in monocultures

Growth of cocultures and corresponding monocultures were assessed through four kinetics parameters, namely latency time (**Latency** = time in hours for the OD₆₀₀ to exceed 0.25), intrinsic growth rate (**r**), maximum observed OD₆₀₀ (**maxOD**) and the area

under the curve (**AUC**). Growth rate (**r**), and area under the curve (**AUC**) were obtained by fitting growth data with a logistic model. The **AUC** is a convenient metric to study microbial growth since it includes all previous metrics (Sprouffske and Wagner 2016, Piccardi et al. 2019). **MaxOD** and **Latency** were directly measured. Growth parameters were assessed after 24 hours of growth since population then reached signal saturation. Moreover, preliminary test did not show significant difference in maximum population after 30 hours compared to 24 hours of growth (data not shown).

We first analysed the monocultures and observed a great interspecific variability for growth dynamics (Fig. 2). All studied parameters except **Latency** showed a significant effect between the species ($p.\text{value}_{\text{maxOD}} \ll 0.01$; $p.\text{value}_r \ll 0.01$; $p.\text{value}_{\text{AUC}} < 0.01$; Fig. 3). For the **AUC**, two groups of species could be distinguished: *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* showing a higher overall growth ($\text{AUC}_{\text{Lt}} = 26.8 \pm 0.7$ h; $\text{AUC}_{\text{Sc}} = 28.2 \pm 1.3$ h; and $\text{AUC}_{\text{Td}} = 26.1 \pm 1.5$ h) compared to *H. uvarum* and *S. bacillaris* that had lower growth ($\text{AUC}_{\text{Hu}} = 18.7 \pm 0.5$ h and $\text{AUC}_{\text{Sb}} = 15.5 \pm 0.6$ h; Fig. 3). Strains of the higher growing species *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* were also logically associated with the highest maximum population ($\text{MaxOD}_{\text{Td}} = 2.11 \pm 0.06$, $\text{MaxOD}_{\text{Sc}} = 2.11 \pm 0.04$, $\text{MaxOD}_{\text{Lt}} = 2.15 \pm 0.02$) and higher growth rate ($r_{\text{Sc}} = 0.43 \pm 0.04$ h⁻¹, $r_{\text{Lt}} = 0.43 \pm 0.02$ h⁻¹) except for *T. delbrueckii*. Indeed, *T. delbrueckii* showed a growth rate ($r_{\text{Td}} = 0.33 \pm 0.01$ h⁻¹) that is closer to that of *H. uvarum* ($r_{\text{Hu}} = 0.30 \pm 0.03$ h⁻¹) that presented a medium maximum population ($\text{MaxOD}_{\text{Hu}} = 1.62 \pm 0.1$). Finally, *S. bacillaris* displayed the lowest maximum population ($\text{MaxOD}_{\text{Sb}} = 1.42 \pm 0.13$) as well as the lowest growth rate ($r_{\text{Sb}} = 0.17 \pm 0.02$ h⁻¹).

Besides interspecific variability, we also observed intraspecific variability for the AUC (P value_{AUC/strains} < 0.01) and **r** (P value_{r/strains} = 0.028; Fig. 3). For example, *L. thermotolerans* Y1240 presented an AUC of 29.44 ± 0.46 h, whereas *L. thermotolerans* CLIB3053 and V7-21 presented an AUC of 25.73 ± 0.17 h, 24.97 ± 0.51 h respectively. This difference might be explained by the lower growth rate of *L. thermotolerans* Y1240 strain ($r = 0.40 \pm 0.01$ h⁻¹) compared to the two other strains ($r_{\text{Lt3053}} = 0.43 \pm 0.003$ h⁻¹, $r_{\text{LtV7-21}} = 0.44 \pm 0.01$ h⁻¹; Fig. 2). Interestingly *L. thermotolerans* Y1240 originated from South Africa while the other two originated from France. Similarly, the strain *T. delbrueckii* LO544, which originates from a different French region, had a 25% lower AUC than the other *T. delbrueckii* strains.

While there is no significant effect of the species for Latency, there is a significant strain effect ($p.\text{value}_{\text{Latency/strains}} \ll 0.001$, Fig. 3). Here the separation is not structured by species but by strains. For example, *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* and *S. bacillaris* all presented one strain whose latency value was different from the others (Fig. 3). For the 15 strains, the latency ranged from 3.48 ± 1.21 h for Td 3337 to 7.66 ± 0.59 h for Td LO544 with an average of 5.98 ± 1.51 h.

Evaluating species-species and strain-strain interaction in cocultures

To determine how the species and strain effect affected growth in cocultures, we tested whether there was a significant effect on the four growth parameters in all cocultures. To this end, we distinguished three types of culture: S₁ strain 1 monoculture, S₂ strain 2 monoculture and Co the corresponding coculture comprising strain 1 and strain 2. Theoretically, four typical outcomes can be distinguished (Fig. 4): when the T-test did not show significant difference between the parameter value of the coculture and the average of the parameter value of the monocultures, it was called

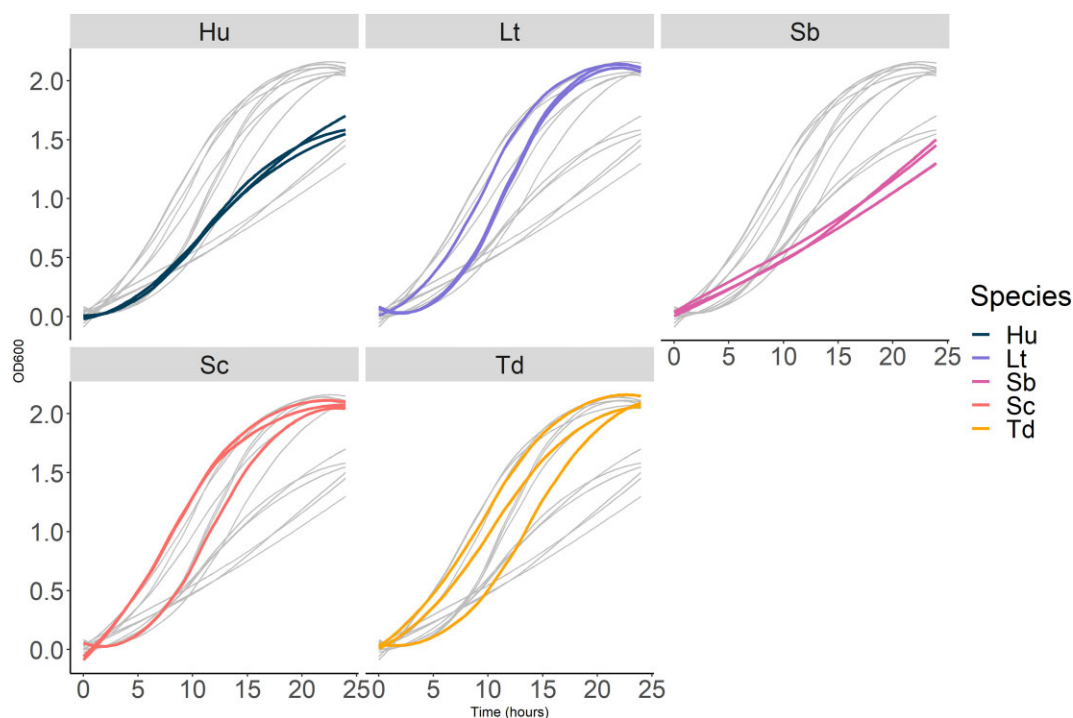


Figure 2. Growth of the 15 monocultures (composed of 50% of fluorescently tagged cells and 50% of WT cells of the same strain) for the 5 species tested in this study: *H. uvarum* (Hu), *L. thermotolerans* (Lt), *S. bacillaris* (Sb), *S. cerevisiae* (Sc) and *T. delbrueckii* (Td). All growth curves are represented in grey, growth curves of all three strains of a species are represented in colored lines and species are separated in facets. Monocultures were done in biological triplicates. Curves were plotted using the Loess smoothing method from R tidyverse package.

case A [for example: $AUC_{Co} \approx (AUC_{S1} + AUC_{S2})/2$], and there is no perceived change in dynamics. If the coculture growth parameter is statistically superior to the best monoculture or inferior to the worst monoculture, it was respectively called cases B and C, where there is a clear positive or negative interaction. In all other cases (case D) the parameter value of the coculture is between monoculture parameters values but it is not possible to determine if there is an interaction or only the effect of respective population density (Fig. 4D). In addition to classifying results according to these categories, we also calculated an interaction index (Id) by comparing for each parameter (growth rate, maximum population, latency and AUC) the coculture value to both monoculture values. We used this index to perform a clustering analysis of all cultures.

When focusing on the AUC, a great majority of cocultures were in the A (77%) and D (33%) cases (Fig. 4, Table 2) where there is little to no perceived interactions. For the other parameters, most cocultures were also in case A or D (Table 2). A few underyielding cases were identified for the maximum population (5%) such as in the coculture of *S. cerevisiae* 59A with *L. thermotolerans* V7-21 (Fig. 5). Only one overyielding case (B) was found for the growth rate in the cocultures of *H. uvarum* 3221 with *T. delbrueckii* 3337 respectively (Fig. 5). Overall, these results would suggest that the measured growth parameters did not appear to identify strong interactions in cocultures.

As we did not observe many extreme changes in population dynamics such as over- and under-yielding, we thus used an interaction index for all four growth parameters to assess the strength of the interaction in addition to the quality of the interaction. Noteworthy, for positive interactions, it was not possible to determine whether the interaction was positive for both species or only one. Regarding the AUC-based heatmap (Fig. 6), negative interaction

were seen in cocultures of all strains of *S. cerevisiae* with *T. delbrueckii* CLIB3337 and *L. thermotolerans* V7-21. The strain *S. cerevisiae* 59A also showed significant negative interactions with all *T. delbrueckii* strains and all *L. thermotolerans* strains. On the contrary, cocultures of *S. bacillaris* with *S. cerevisiae*, *H. uvarum* or *T. delbrueckii* tended to have positive index but only cocultures of *S. bacillaris* CLIB3147 with *S. cerevisiae* VIN13 or *S. bacillaris* with either *T. delbrueckii* CLIB3337 or *T. delbrueckii* CLIB3069 showed statistically significant positive interactions.

The other growth parameters also corresponded to the interactions quantified in terms of AUC. Cocultures of *S. bacillaris* with other species tended to be positive. However, contrary to the other parameters, negative interactions were revealed by the latency parameter in cocultures of *S. bacillaris* with *L. thermotolerans* or *T. delbrueckii* with even underyielding for *S. bacillaris* 3147 and *L. thermotolerans* Y1240 (Fig. S2). For the latency, a positive interaction index indicates a longer latency time, hence a delayed growth so a negative interaction.

Negative interactions between *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* or *L. thermotolerans* were also revealed by the interaction index of growth rate, maximum population, and latency. Underyielding (Fig. 3C) was observed for growth rate in cocultures of *S. cerevisiae* VIN13 with *L. thermotolerans* CLIB3053 or *L. thermotolerans* V7-21 as well as for the maximum population in cocultures of *S. cerevisiae* 59A with *T. delbrueckii* 3069, *T. delbrueckii* LO544 and *L. thermotolerans* V7-21 (Fig. S3). The latency also revealed some negative interactions between *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii*.

In addition to interspecific interactions, the maximum population parameters revealed intra-specific negative interactions for the cocultures of *T. delbrueckii* 3069 with *T. delbrueckii* LO544, and *L. thermotolerans* CLIB3053 with *L. thermotolerans* Y1240 with negative interaction strong enough to induce underyielding (Fig. S2).

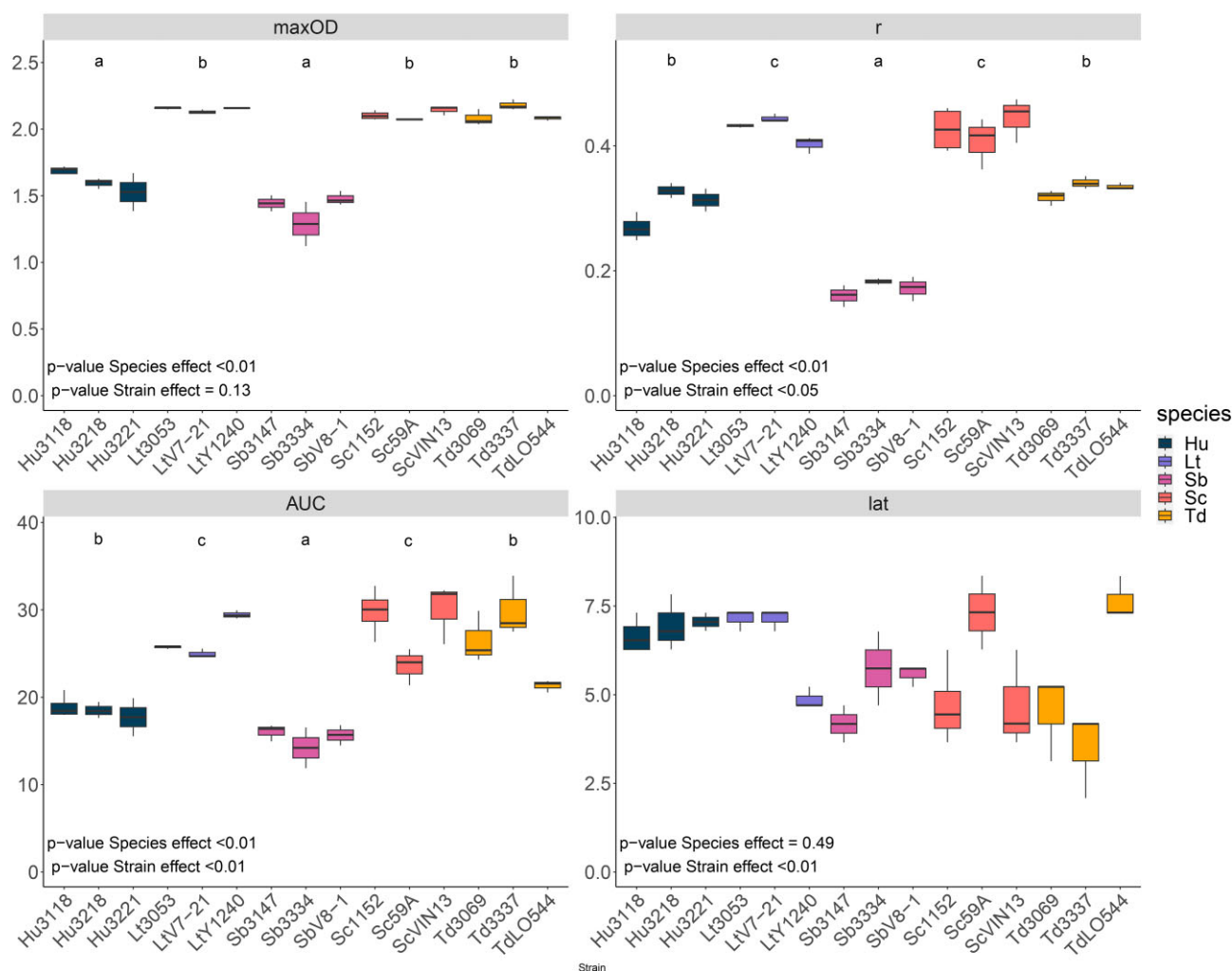


Figure 3. Growth parameters of the 15 monocultures: observed maximum population (maxOD), growth rate hours⁻¹ (r), area under the curve (AUC) and latency in hours (lat, time to reach OD₆₀₀ = 0.25). r and AUC were computed using modelling from the GrowthCurver R package. Monocultures were done in biological triplicates. Letters a,b,c indicate the statistical group of the species. Species effect and strain effect were evaluated using a nested ANOVA: P-values of both fixed (species effect) and random effect (strain effect) are indicated for each growth parameter. H. uvarum (Hu), L. thermotolerans (Lt), S. bacillaris (Sb), S. cerevisiae (Sc) and T. delbrueckii (Td).

Table 2. Count and percentage of cocultures types for all four growth parameters. A: no statistical difference between the coculture parameter value and the average of both monocultures (evaluated by T-test). B: overyielding—the coculture parameter value is higher than the maximum of both monocultures (T-test with maximum). C: underyielding—the coculture parameter value is lower than the minimum of both monocultures (T-test with minimum). D: the coculture parameter value is between both monocultures and statistically different from the average of both monocultures.

Growth parameter	Coculture type	Number of cases	Percentage of cases
Area under the curve (AUC)	A	81	77
	D	24	23
	B	2	2
	D	34	32
Maximum population (maxOD)	A	60	57
	C	5	5
	D	40	38
	D	29	28
Growth rate (r)	A	73	70
	B	1	1
	C	2	2
	D	29	28

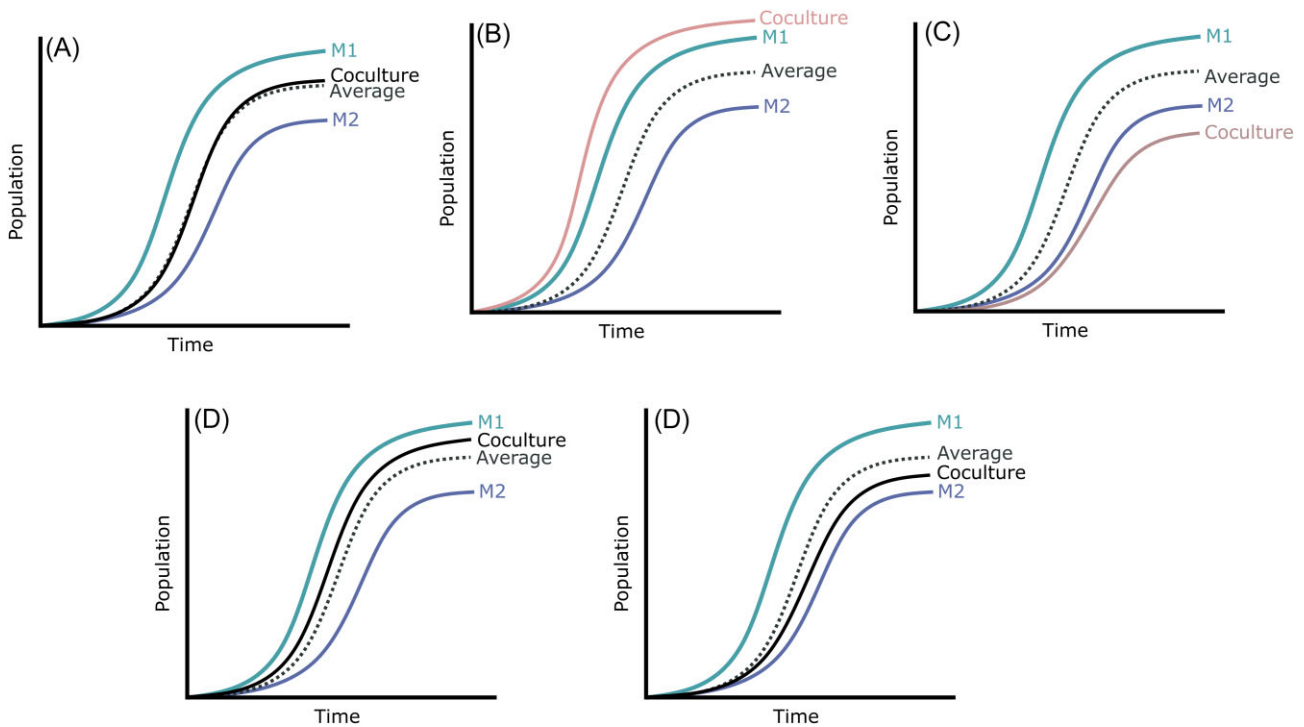


Figure 4. Classification of the possible outcomes of co-cultures compared to monocultures. A: No interaction—co-culture relates to the average of both monocultures, B: Overyielding—coculture is greater than both monocultures, C: Underyielding—coculture is worse than both monocultures, D: Little interaction—coculture significantly differs from the average of both monocultures but remains in the range of both. S1 = strain 1, S2 = S2, in dashed line = the calculated average of both monocultures.

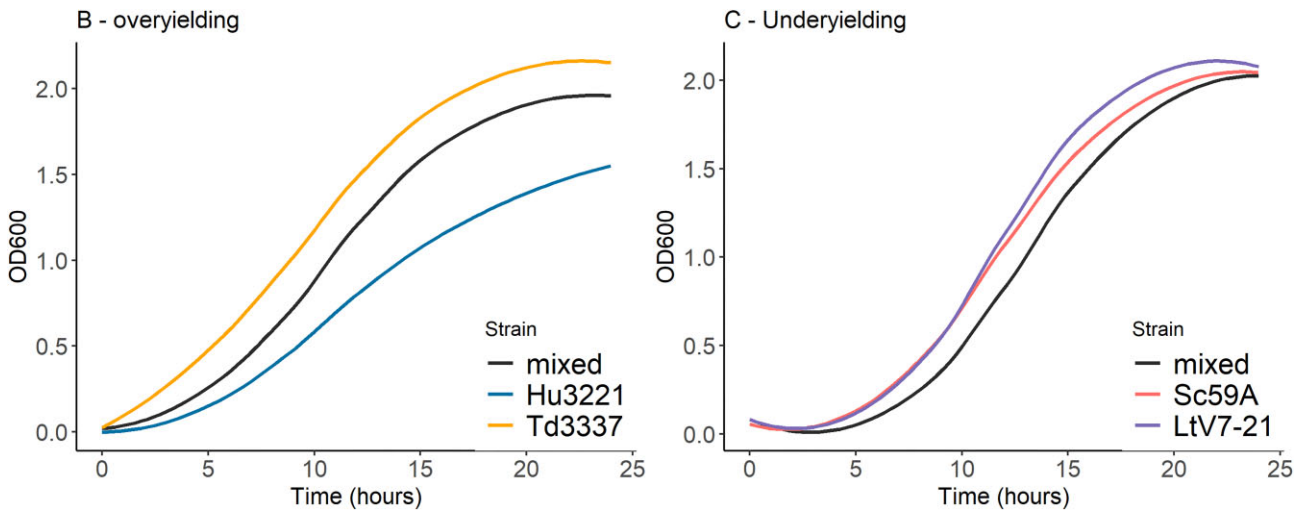


Figure 5. Examples of case B (left panel) and C (right panel). The only overyielding observed was for the growth rate of the coculture of *H. uvarum* 3221 and *T. delbrueckii* 3337. Underyielding was observed with the maximum population of the coculture of *L. thermotolerans* V7-21 and *S. cerevisiae* 59A. Four biological replicates were run for each cocultures.

Analysis of the interaction matrices

Another interesting result obtained from the heatmap is the structure of the interaction matrix. The clustering of rows and columns was based only on similarity of the interaction index between strains (Euclidean distance with complete linkage), and the relevance of clusters was checked by bootstrapping. We observed that the resulting clusters based on AUC interaction index values fit species level for *H. uvarum*, *S. cerevisiae* and *S. bacillaris* (Fig. 6). Cluster 2 includes both *L. thermotolerans* strains and *T. delbrueckii* strains (CLIB 3069 and CLIB 3337). Cluster 5 includes

T. delbrueckii LO544 only, however bootstrapping analysis of the clusters showed the significance of cluster 5 was low (Jaccard index = 0.64). Altogether, this would suggest that species rather than strain is the main level determining interactions in cocultures with two species, even though strain can impact the strength of the interaction since values of the interaction index varied between strains of the same species. For instance, *T. delbrueckii* 3069 and 3337 showed great positive interactions with *S. bacillaris* V8-1 whereas this interaction was more neutral with *S. bacillaris* 3147.

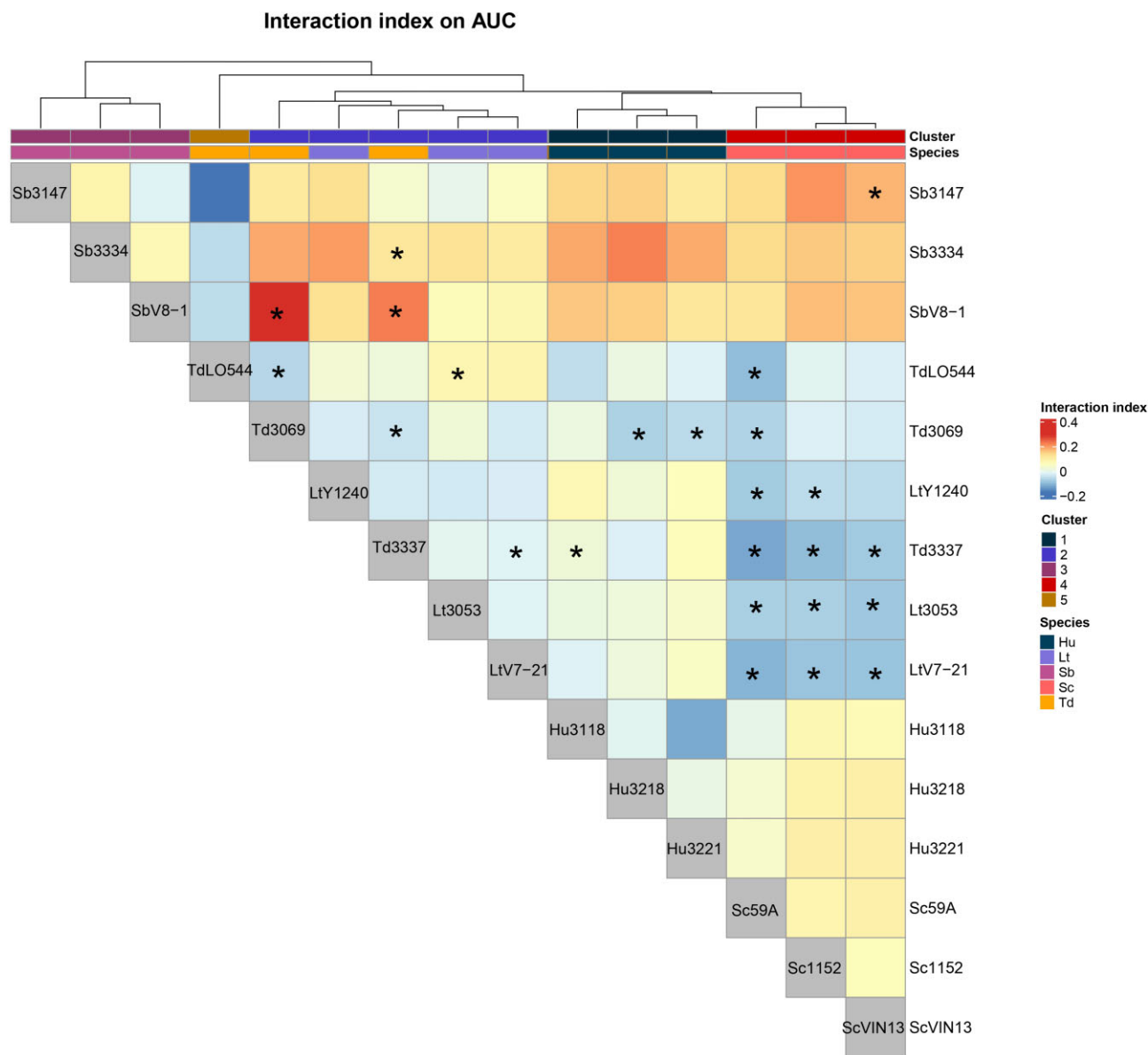


Figure 6. Heatmap of the AUC index: positive index means an overall higher growth of the coculture. * denotes cocultures whose AUC is significantly different from the average AUC of both monocultures. Colors of cluster and species, as well as addition of the * were edited manually from the PDF file. The original figure from R is available in the data repository.

Clustering on the growth rate interaction index also fitted mostly to the species level; with the only discrepancy being *S. cerevisiae* 59A that clustered with *T. delbrueckii* strains (Fig. S1). There were some examples of strain-level interactions on growth rate, for example, *T. delbrueckii* 3069 and 3337 exhibited opposing negative and positive interactions respectively with *H. uvarum*. For the maximum population and latency time, there were differing clustering patterns (Figs S2 and S3). For the interaction index data from the latency time, strains of *S. bacillaris* and strains of *T. delbrueckii* did not group together, while strains of other species did group into respective clusters (Fig. S2). For the maximum population metric, *S. cerevisiae*, *L. thermotolerans* and two strains of *T. delbrueckii* strains grouped together in a single cluster, while strains of other species did group into respective clusters (Fig. S3).

The fact that structures of the interaction matrix didn't follow the species level for the maximum population may be related to limitations of measures by OD that tend to be quickly saturated

(Stevenson et al. 2016). This might also result from the intrinsic growth phenotypes of each strain since monocultures that were already grouped together for the maximum population, namely *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, and *L. thermotolerans*, were clustered together. The structure found for the phenotype of monocultures might also explain the fact that in cocultures, as for monocultures, no predominant species effect was observed for the latency.

Population dynamics highlighted by change in relative abundance

To evaluate the influence of coculture on the population composition, which is an important metric in determining competitive phenotypes, we calculated fold change with the relative abundance of both strains in each cocultures at start (T0) and after 24 hours of growth (T24).

The population abundances of most strains within coculture stayed consistent throughout the measured samples. In

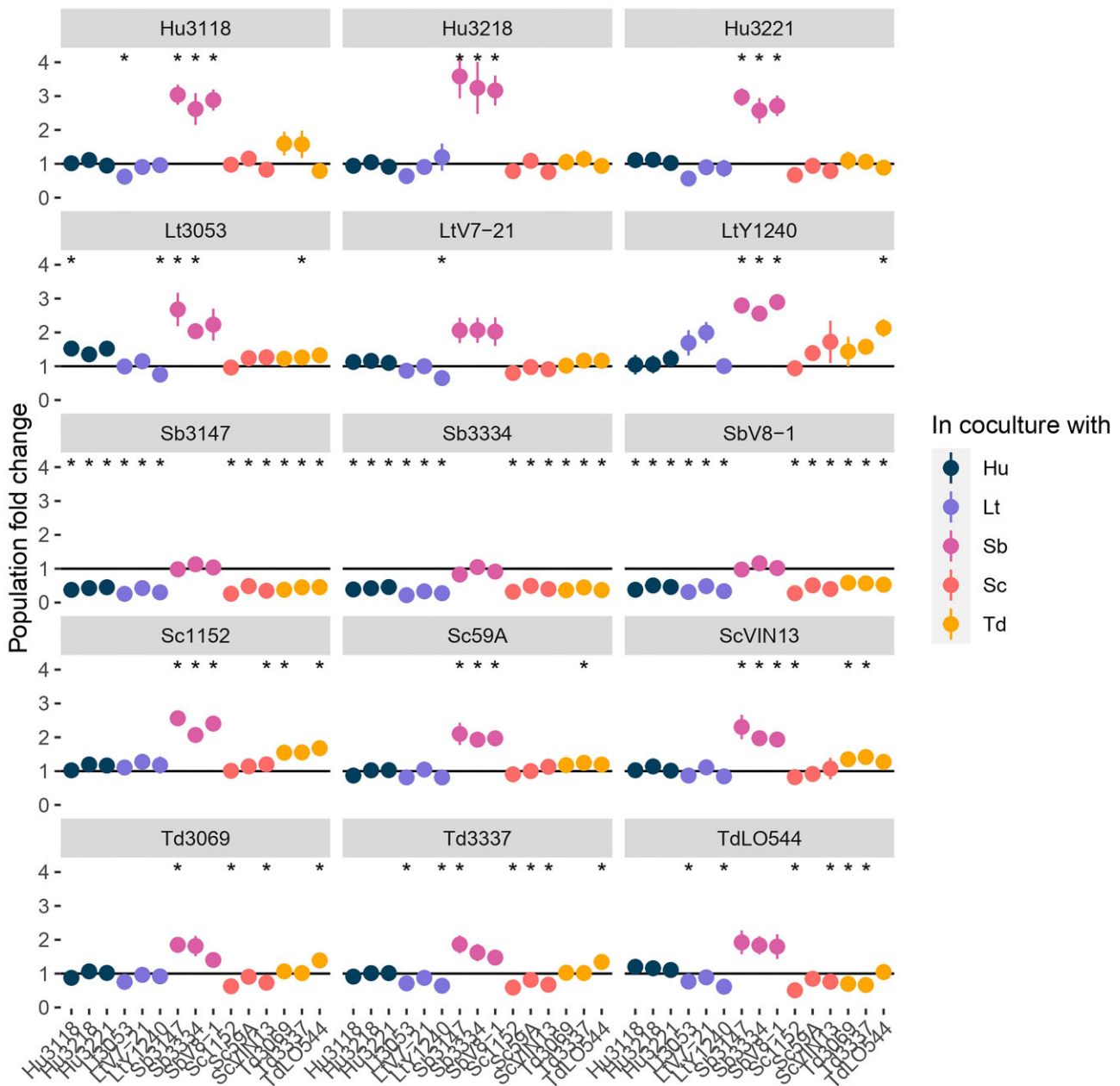


Figure 7. Population fold change after 24-hour growth in SGM425 for each strain (panel) in coculture with the strain indicated in the column. Colors of the dot correspond to the species of the strain in the column. * denotes significant difference of the fold change to 1 as tested by t-test.

particular, for monocultures, no change in relative abundance of the wild-type and tagged strains were observed, indicating transformants did not exhibit differences in fitness as compared to wild-type strains (Fig. 7). On the contrary, all strains of *S. bacillaris* showed significant decrease in relative abundance after 24 h when in coculture with other species, with a 2-fold reduction on average for the 3 strains (fold change = 0.52 ± 0.02). This is logically associated with an increased abundance of the counterpart species. The fold change in favour of better growing strains when cocultured with *S. bacillaris* could explain the positive interaction observed with maximum population and AUC for these cocultures (Fig. 6, Fig. S3) since the maximum population observed is the result of their respective maximum OD600. Fold change of cocultures of other species were less sizable and few were significant. Surprisingly, besides with *S. bacillaris*, *S. cerevisiae* abundance increased

only in cocultures with *T. delbrueckii*. For instance, *S. cerevisiae* strain 1152 had a fold change of 1.52 ± 0.09 and 1.68 ± 0.2 when cocultured with *T. delbrueckii* 3069 and LO544 respectively. *L. thermotolerans* had significant increased abundance in some strain-specific cases such as *L. thermotolerans* 3053 with *H. uvarum* 3118 (1.52 ± 0.13) or *L. thermotolerans* Y1240 in coculture with *T. delbrueckii* LO544 (2.13 ± 0.26).

In terms of strain-strain differences, the data shows fold-change variations in intraspecific cocultures of *T. delbrueckii* (Fig. 6). For instance, *T. delbrueckii* LO544 relative abundance declined when in presence of either *T. delbrueckii* 3069 or 3337 (fold change of 0.70 ± 0.06 and 0.66 ± 0.08 , respectively). Two factors could explain this intraspecific effect. It could either be related to the longer latency phase of the strain LO544 (Fig. 3). It might also be the results of intraspecific negative interactions between strains

of *T. delbrueckii* as observed with the significantly reduced maximum population in cocultures of *T. delbrueckii* LO544 with *T. delbrueckii* 3069 or 3337 compared to monocultures. On the contrary *H. uvarum*, *S. bacillaris*, and *S. cerevisiae* showed no fold change when cocultured with a strain of the same species.

Discussion

In the present study, we conducted an experiment aiming to explore ecological questions regarding the relative importance of species and strain for determining the nature and intensity of yeast-yeast interactions. For this purpose, we studied population-specific and over-all growth kinetics of all pairwise cocultures of 15 total strains comprising 5 different yeast with a simplified framework of the wine environment.

The approach used in this study involved tagging all strains with fluorescent proteins to enable species detection with cytometry at the end of growth. With the current lack of information on the genetics of wine related NS, molecular tools available are still scarce and transformation of NS remains highly challenging (Masneuf-Pomarede et al. 2016). To our knowledge, only one article reported transformation with homologous recombination for *H. uvarum* (Badura et al. 2021), and one article reported transformation of *Starmerella bombicola* (Gonçalves et al. 2018) but none specifically reported transformation of *S. bacillaris*. The strains we constructed will therefore be valuable tools in the future for studies on yeast. However, more research should focus on transformation of NS since there are still species that were reported to be unable to integrate cassette at the target locus, such as *M. pulcherrima* (Gordon et al. 2019, Moreno-Beltrán et al. 2021). The tagging strategy coupled with cytometry, which is a powerful analytical tool for population analysis of fermentation (Longin et al. 2017), enabled us to discriminate two strains in cocultures. This approach can also be applied to the detection of more species (Conacher et al. 2020). A limitation of the study is that our data only focus on the growth patterns of species, which limit our understanding on the respective growth of each strain, as well as the impact of strains on the resulting wine composition. Moreover, oxygen availability in microplates do not reflect real fermentation conditions. However, this method makes it possible to monitor growth of multiple pair-combination, and is very useful for high-throughput protocols.

In this study, comparison of growth kinetics of cocultures and monocultures based on an interaction index suggested a predominant effect of the species level over the strain on the interactions structure. The cluster analysis resulting from the interaction matrix for the AUC and the growth rate displayed an overlap of clusters with the species level, despite the initial intra-specific diversity observed in monocultures. Altogether, our results would indicate that population dynamics between two species are mainly driven by the species type, while the strain would mostly affect the strength of the interaction. This is an important consideration in the design of synthetic communities.

It is interesting to note that most cocultures displayed little to no perceived interactions (cases A Table 2, Fig. 3). These results would reflect those observed in some bacterial cocultures, either from strains of the same species or spanning several families and genera, where inhibition interactions constituted less than 15% of pairwise interactions (Russel et al. 2017, Ramia et al. 2020). It could also result from the microtiter plate method that do not allow a detailed analysis of minor changes, especially in the respective growth of each strain. Nevertheless, our study provides a broader insight in yeast interactions, especially NS/NS interactions that

are still poorly documented (Zilelidou and Nisiotou 2021). Most interactions that have been studied to date are negative interactions found between *S. cerevisiae* and NS, but some positive interactions through crossfeeding were also identified between *L. thermotolerans* and *Zygosaccharomyces* spp. for example (Csoma et al. 2020). Further research is needed to confirm our findings, especially with more species to include more genera as well as species from the same genera similarly to a recent study that investigated cocultures of 60 strains of wine yeast in coculture with *S. cerevisiae* (Ruiz et al. 2023). In addition, our findings are limited to only one synthetic media, whereas interactions are known to be modulated by environments (Piccardi et al. 2019, Gao et al. 2021). Thus, it would be relevant to test these combinations in environments closer to actual wine fermentation, for instance using different natural grape musts. Indeed, the wine environment includes various stressors that have been shown to influence population dynamics, even at the strain level as shown by Schmidt for *S. cerevisiae* (Schmidt et al. 2020). The importance of strains variability might then lie in the adaptability of one species to different environments. Moreover, the strains evaluated here have all been isolated from wine environments. Evidence clearly supports that this anthropic environment has evolutionarily shaped the associated yeast community (Conacher et al. 2019, De Guidi et al. 2023). The interactions between the species and strains evaluated here might therefore be the result of wine-specific evolutionary adaptations linked to direct interspecies biotic selection pressures. It would be interesting to add strains isolated from other environments to our analysis.

Phylogenetic or metabolic distance might be part of the explanation of the relevance of species in pairwise interactions. For instance, Russel et al. showed that bacterial species phylogenetically closer tended to display higher competition, the assumption being that phylogenetically closer species have closer niches (Russel et al. 2017). Peay et al. (2012) obtained similar results for yeasts in a floral nectar flower community assembly. Our data would be in accordance with these findings since we observed significant negative interactions between species such as *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* or *L. thermotolerans*, even though Ruiz et al. (2023) identified positive interactions between *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* or *T. delbrueckii*. In our study, these three species showed similar growth patterns in monocultures, except for a lower growth rate for *T. delbrueckii* strains (Fig. 3), and are known to be phylogenetically closer together than *S. bacillaris* and *H. uvarum* (Kurtzman 2011, Lemos Junior et al. 2018). Moreover, they also seem to have similar amino-acid consumption and are reported to be intermediate or good fermentative species, which might result in higher competition (Prior et al. 2019, Roca-Mesa et al. 2020). However, if it was only a question of phylogenetic distance, then there would be very high intraspecific competition which we observed only for *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans* (fold change and maximum population; Fig. 7; Fig. S3) while interactions in intraspecific cocultures for the other 3 species were mostly neutral. This might indicate other interaction mechanisms are also involved, such as contact-dependent interactions for example. For instance, *S. cerevisiae* seems to induce contact-dependent cell-death of other species such as *L. thermotolerans* (Petitgonnet et al. 2019, Luyt et al. 2021). Although, for *T. delbrueckii*, Taillandier et al. (2014) excluded contact-mediated interactions between *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* but instead hypothesized that *T. delbrueckii* was sensitive to a killer toxin produced by *S. cerevisiae*. On the other hand, negative interactions mediated by cell-contact have been reported between *S. bacillaris* and *S. cerevisiae*, whereas we mostly identified positive interactions between *S. bacillaris* strains and the other

species. However, our data must be interpreted with caution since our method does not allow us to evaluate the respective growth of *S. bacillaris* and *S. cerevisiae*. Thus *S. bacillaris* could be outgrown by other species due to its slow growth seen in monocultures, consistent with its fold change < 1, and reaching a maximum population closer to the other species' monoculture.

In conclusion, the experimental design implemented in this study, based on a comparison of growth in cocultures and monocultures of 15 wine yeast strains including 5 different species, provided insight in the relevance of the species level and strains in population dynamics in cocultures. Our results indicate that the species level would be the driver of the type of interaction, whereas the strain would modulate the intensity of the interaction. This theoretical knowledge offer new perspectives on the interactions between yeast, especially between non-*Saccharomyces* species and raise questions on the different mechanisms involved in inter- and intra-specific interactions.

Author contributions

Eléonore Pourcelot (Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualisation, Writing—original draft preparation), Cleo Conacher (Methodology, Investigation, Resources, Validation, Writing—review & editing), Thérèse Marlin (Investigation), Florian Bauer (Conceptualization, Project administration, Resources, Supervision, Writing—review & editing), Virginie Galeote (Conceptualization, Project administration, Supervision, Writing—original draft preparation), and Thibault Nidelet (Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Validation, Visualisation, Writing—original draft preparation).

Acknowledgements

We are thankful to H Devillers for his advice with the data analysis. We thank C Neuvéglise, as well as the INRAE (CIRM-Levures) and P Lucas from the CRBO for providing strains used in this study.

Supplementary data

Supplementary data is available at [FEMSYR Journal](https://femsyrjournal.com) online.

Conflicts of interest: None declared.

Funding

This work was supported by the French doctoral school GAIA—Montpellier University; the French Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement (INRAE); and the Stellenbosch University.

Data availability

All source data and codes, from which the figures are based, are available through the Zenodo repository: <https://doi.org/10.5281/zenodo.7915768> under a Creative Commons Attribution (CC-BY) licence.

References

Badura J, van Wyk N, Brezina S et al. Development of genetic modification tools for *Hanseniaspora uvarum*. *IJMS* 2021;**22**:1943.

- Bely M, Sablayrolles J-M, Barre P. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J Ferment Bioeng* 1990;**70**:246–52.
- Binati RL, Lemos Junior WJF, Luzzini G et al. 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.
- Bordet F, Joran A, Klein G et al. Yeast-yeast interactions: mechanisms, methodologies and impact on composition. *Microorganisms* 2020;**8**:600.
- Bordet F, Roullier-Gall C, Ballester J et al. Different wines from different yeasts? “*Saccharomyces cerevisiae* intraspecies differentiation by metabolomic signature and sensory patterns in wine.” *Microorganisms* 2021;**9**:2327.
- Boynnton PJ. The ecology of killer yeasts: interference competition in natural habitats. *Yeast* 2019;**36**:473–85.
- Cai P, Gao J, Zhou Y. CRISPR-mediated genome editing in non-conventional yeasts for biotechnological applications. *Microb Cell Fact* 2019;**18**:63.
- Camarasa C, Sanchez I, Brial P et al. Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. *PLoS One* 2011;**6**:e25147.
- Ciani M, Capece A, Comitini F et al. Yeast interactions in inoculated wine fermentation. *Front Microbiol* 2016;**7**:555.
- Ciani M, Comitini F, Mannazzu I et al. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res* 2010;**10**:123–33.
- Conacher CG, Naidoo-Blassoples RK, Rossouw D et al. 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**:5547–62.
- Conacher CG, Rossouw D, Bauer FFB. Peer pressure: evolutionary responses to biotic pressures in wine yeasts. *FEMS Yeast Res* 2019;**19**:foz072.
- Csoma H, Kállai Z, Antunovics Z et al. Vinification without *Saccharomyces*: interacting Osmotolerant and “Spoilage” Yeast Communities in Fermenting and Ageing Botrytised High-Sugar Wines (Tokaj Essence). *Microorganisms* 2020;**9**:19.
- De Guidi I, Legras J-L, Galeote V et al. Yeast domestication in fermented food and beverages: past research and new avenues. *Curr Opin Food Sci* 2023;**51**:101032.
- Drumonde-Neves J, Fernandes T, Lima T et al. Learning from 80 years of studies: a comprehensive catalogue of non-*Saccharomyces* yeasts associated with viticulture and winemaking. *FEMS Yeast Res* 2021;**21**:foab017.
- Englezos V, Giacosa S, Rantsiou K et al. *Starmerella bacillaris* in wine-making: opportunities and risks. *Curr Opin Food Sci* 2017;**17**:30–5.
- Evers MS, Roullier-Gall C, Morge C et al. Vitamins in wine: which, what for, and how much? *Comprehen Rev Food Sci Food Safety* 2021;**20**:2991–3035.
- Fleet G. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol* 2003;**86**:11–22.
- Fleet GH. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Curr Opin Biotechnol* 2007;**18**:170–5.
- Galati A, Schifani G, Crescimanno M et al. “Natural wine” consumers and interest in label information: an analysis of willingness to pay in a new Italian wine market segment. *J Cleaner Product* 2019;**227**:405–13.
- Gao C-H, Cao H, Cai P et al. The initial inoculation ratio regulates bacterial coculture interactions and metabolic capacity. *ISME J* 2021;**15**:29–40.

- Gibson DG, Young L, Chuang R-Y et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 2009;**6**:343–5.
- Gonçalves C, Wisecaver JH, Kominek J et al. Evidence for loss and reacquisition of alcoholic fermentation in a fructophilic yeast lineage. *eLife* 2018;**7**:e33034.
- Gordon ZB, Soltysiak MPM, Leichthammer C et al. Development of a Transformation Method for *Metschnikowia borealis* and other CUG-Serine Yeasts. *Genes* 2019;**10**:78.
- Gu Z. Complex heatmap visualization. *Imeta* 2022;**1**. <https://doi.org/10.1002/imt2.43>.
- Güldener U, Heck S, Fiedler T et al. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 1996;**24**:2519–24.
- Harlé O, Legrand J, Tesnière C et al. Investigations of the mechanisms of interactions between four non-conventional species with *Saccharomyces cerevisiae* in oenological conditions. *PLoS One* 2020;**15**:e0233285.
- Hennig C. Fpc: Flexible procedures for clustering. R Package Version 2. 2010, 0–3.
- Hranilovic A, Bely M, Masneuf-Pomarede I et al. The evolution of *Lachancea thermotolerans* is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems. *PLoS One* 2017;**12**:0184652.
- Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *SAJEV* 2006;**27**:15–39.
- Kurtzman CP. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomala*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2011;**99**:13–23.
- Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB. lmerTest package: tests in linear mixed effects models. *J Stat Soft* 2017;**82**. <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>.
- Lee S, Lim WA, Thorn KS. Improved blue, green, and red fluorescent protein tagging vectors for *S. cerevisiae*. *PLoS One* 2013;**8**:67902.
- Legras J-L, Merdinoglu D, Cornuet J-M et al. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol Ecol* 2007;**16**:2091–102.
- Lemos Junior WJF, da Silva Duarte V, Treu L et al. Whole genome comparison of two *Starmerella bacillaris* strains with other wine yeasts uncovers genes involved in modulating important winemaking traits. *FEMS Yeast Res* 2018;**18**:foy069.
- Lin-Cereghino J, Wong WW, Xiong S et al. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BioTechniques* 2005;**38**:444648.
- Longin C, Petitgonnet C, Guilloux-Benatier M et al. Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiology* 2017;**62**:221–31.
- Luyt NA, Beaufort S, Divol B et al. Phenotypic characterization of cell-to-cell interactions between two yeast species during alcoholic fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 2021;**37**:186.
- Masneuf-Pomarede I, Bely M, Marullo P et al. The Genetics of Non-conventional Wine Yeasts: current Knowledge and Future Challenges. *Front Microbiol* 2016;**6**:1563.
- Masneuf-Pomarede I, Juquin E, Miot-Sertier C et al. The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments. *FEMS Yeast Research* 2015;**15**:045.
- Mencher A, Morales P, Curiel JA et al. *Metschnikowia pulcherrima* represses aerobic respiration in *Saccharomyces cerevisiae* suggesting a direct response to co-cultivation. *Food Microbiology* 2021;**94**:103670.
- Mendiburu F, Yaseen M. Agricolae: statistical Procedures for Agricultural Research. R Package Version 1.4.0 2020:1–8. <https://myaseen208.github.io/agricolae/https://cran.r-project.org/package=agricolae>.
- Morata A, Loira I, Tesfaye W et al. *Lachancea thermotolerans* Applications in Wine Technology. *Fermentation* 2018;**4**:53.
- Moreno-Beltrán M, Gore-Lloyd D, Chuck C et al. Variation among *Metschnikowia pulcherrima* Isolates for Genetic Modification and Homologous Recombination. *Microorganisms* 2021;**9**:290.
- Nambu-Nishida Y, Nishida K, Hasunuma T et al. Development of a comprehensive set of tools for genome engineering in a cold- and thermo-tolerant *Kluyveromyces marxianus* yeast strain. *Sci Rep* 2017;**7**:8993.
- Navarrete C, Martínez LJ. Non-conventional yeasts as superior production platforms for sustainable fermentation based biomanufacturing processes. *AIMS Bioeng* 2020;**7**:289–305.
- Peay KG, Belisle M, Fukami T. Phylogenetic relatedness predicts priority effects in nectar yeast communities. *Proc R Soc B* 2012;**279**:749–58.
- Pérez-Torrado R, Barrio E, Querol A. Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces non-cerevisiae* and its hybrids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2018;**58**:1780–90.
- Petitgonnet C, Klein GL, Roullier-Gall C et al. Influence of cell-cell contact between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* on yeast interactions and the exo-metabolome. *Food Microbiology* 2019;**83**:122–33.
- Piccardi P, Vessman B, Mitri S. Toxicity drives facilitation between 4 bacterial species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;**116**:15979–84.
- Polizzotto G, Barone E, Ponticello G et al. Isolation, identification and oenological characterization of non-*Saccharomyces* yeasts in a Mediterranean island. *Lett Appl Microbiol* 2016;**63**:131–8.
- Prior KJ, Bauer FF, Divol B. The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine. *Food Microbiology* 2019;**79**:75–84.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2022.
- Ramia NE, Mangavel C, Gaiani C et al. Nested structure of intraspecific competition network in *Carnobacterium maltaromaticum*. *Sci Rep* 2020;**10**:7335.
- Renault P, Coulon J, Revel G et al. Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *Int J Food Microbiol* 2015;**207**:40–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037>.
- Roca-Mesa H, Sendra S, Mas A et al. Nitrogen preferences during alcoholic fermentation of different non-*Saccharomyces* yeasts of oenological interest. *Microorganisms* 2020;**8**:157.
- Rollero S, Bloem A, Ortiz-Julien A et al. Altered fermentation performances, growth, and metabolic footprints reveal competition for nutrients between yeast species inoculated in synthetic grape juice-like medium. *Front Microbiol* 2018;**9**:196.
- Rossouw D, Bagheri B, Setati ME et al. Co-flocculation of yeast species, a new mechanism to govern population dynamics in microbial ecosystems. *PLoS One* 2015;**10**:0136249.
- Rossouw D, Meiring SP, Bauer FF. Modifying *Saccharomyces cerevisiae* adhesion properties regulates yeast ecosystem dynamics. *mSphere* 2018;**3**:e00383–18.
- Roudil L, Russo P, Berbegal C et al. Non-*Saccharomyces* commercial starter cultures: scientific trends, recent patents and innovation in the wine sector. *Recent Pat Food Nutr Agr* 2020;**11**:27–39.
- Ruiz J, de Celis M, Diaz-Colunga J et al. Predictability of the community-function landscape in wine yeast ecosystems. *Mol Syst Biol* 2023;**e11613**. <https://doi.org/10.15252/msb.202311613>.
- Russel J, Røder HL, Madsen JS et al. Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;**114**:10684–8.

- Schmidt SA, Kolouchova R, Forgan AH et al. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast competitive fitness in enologically relevant environments by barcode sequencing. *G3 Bethesda Md* 2020;**10**:591–603.
- Sheff MA, Thorn KS. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2004;**21**:661–70.
- Silva-Sousa F, Fernandes T, Pereira F et al. *Torulaspota delbrueckii* phenotypic and metabolic profiling towards its biotechnological exploitation. *JoF* 2022;**8**:569.
- Simonin S, Alexandre H, Nikolantonaki M et al. Inoculation of *Torulaspota delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking. *Food Res Int* 2018;**107**:451–61.
- Sipiczki M. *Metschnikowia pulcherrima* and related Pulcherrimin-producing yeasts: fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. *Microorganisms* 2020;**8**:1029.
- Sprouffske K, Wagner A. Growthcurver: an R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. *BMC Bioinf* 2016;**17**:172.
- Stevenson K, McVey AF, Clark IBN et al. General calibration of microbial growth in microplate readers. *Sci Rep* 2016;**6**:38828. <https://doi.org/10.1038/srep38828>.
- Taillandier P, Lai QP, Julien-Ortiz A et al. Interactions between *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World J Microbiol Biotechnol* 2014;**30**:1959–67.
- Tronchoni J, Curiel JA, Morales P et al. Early transcriptional response to biotic stress in mixed starter fermentations involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii*. *Int J Food Microbiol* 2017;**241**:60–8.
- Varela C, Borneman AR. Yeasts found in vineyards and wineries: yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast* 2017;**34**:111–28.
- 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**:502.
- Zilelidou EA, Nisiotou A. Understanding wine through yeast interactions. *Microorganisms* 2021;**9**:1620.

Supplementary Data

Supplementary Table 1: Plasmid list

Plasmid name	Features	Purpose	Origin	AddGeneRef/MTF
pFA6a-link-yoEGFP-Kan	pFA6 backbone, yeast optimised EGFP, Kanamycin resistance gene	Non-specific tagging with EGFP using G418 selection	Lee et al., 2013	#44900
pFA6a-link-yEmCitrine-Hygro	pFA6 backbone, yeast optimised monomeric Citrine, Hygromycin resistance gene	Construction of plasmid with hygromycin resistance gene	Sheff et al., 2004	#44645
pFA6a-TEF2Pr-eGFP-ADH1-NATMX	pFA6 backbone, EGFP with TEF2 promoter, Nourseothricin resistance gene	Construction of plasmid with nourseothricin resistance gene	Breslow et al., 2008	2559
pFA6a-link-yEGFP-NAT1	pFA6 backbone, yeast optimised EGFP, Nourseothricin resistance gene	Non-specific tagging with EGFP using nourseothricin selection	This study	4882
pFA6a-link-yoEGFP-hph	pFA6 backbone, yeast optimised EGFP, hygromycin resistance gene	Non-specific tagging with EGFP using hygromycin selection	This study	4884
pFA6-TDH3.1kb.Hu-GFP-Kan	pFA6 backbone, yeast optimised EGFP, Kanamycin resistance gene, homologous sequence of 1 kb specific to <i>H. uvarum</i> TDH3 ortholog	<i>H. uvarum</i> specific tagging with EGFP using kanamycin selection	This study	4880
pFA6-TDH3.1kb.Sb-GFP-hph	pFA6 backbone, yeast optimised EGFP, Hygromycin resistance gene, homologous sequence of 1 kb specific to <i>S. bacillaris</i> TDH3 ortholog	<i>S. bacillaris</i> specific tagging with EGFP using hygromycin selection	This study	4888
pFA6-TDH3.1kb.Td-GFP-hph	pFA6 backbone, yeast optimised EGFP, Hygromycin resistance gene, homologous sequence of 1 kb specific to <i>T. delbrueckii</i> TDH3 ortholog	<i>T. delbrueckii</i> specific tagging with EGFP using hygromycin selection	This study	4890

Supplementary Table 2: Primer list for plasmid construction

Plasmide name	Primer name	Sequence (5'→3')	Template DNA
pFA6a-EGFP-hphMX	TSapF_TSap-Hyg	agggcaaaggaataatcagctactgacaataaaaagattcttg	<i>pFA6a-link-yoEGFP-Kan</i>
	TSapR_TSap-Hyg	agttcaggctttttaccatggttgtttatgttcggatgt	
	HygF_TSap-Hyg	acatccgaacataaacaacctgggtaaaaagcctgaact	<i>pFA6a-yEmCitrine-Hygro</i>
	HygR_TSap-Hyg	agaatctttttattgtcagctactgattattcctttgcct	
pFA6a-EGFP-natMX	FPF_FP-NAT	tgagcatgccctcccctaatacagctactgacaataaaaaga	<i>pFA6a-link-yoEGFP-Kan</i>
	FPR_FP-NAT	tcgtcaagagtggtagccatggttgtttatgttcggatgt	
	NATF_FP-NAT.lg	acatccgaacataaacaacctgggtaccactcttgacgac	<i>pFA6a-TEF2Pr-eGFP-ADH1-NATMX4</i>
	NATR_FP-NAT.lg	ctttttattgtcagctactgattaggggcaggcatgctca	
pFA6-TDH3.Hu.1kb-GFP-Kan	pFA6-TDH3-Hu1kb-For	atttctaaacttttatattgatcagatccactagtggcct	<i>pFA6a-link-yoEGFP-Kan</i>
	pFA6-TDH3-Hu1kb-Rev	ccgaaaccgttaatggaaacgatccgtcgacctgcagcgt	
	H1-TDH3-Uni1kb-For	acgctgcaggtcgacggatcagttgctattaacggttcgg	<i>H. uvarum</i> CLIB3221
	H1-TDH3-Hu1kb-Rev	attaaccagcaccgtcaccgttcttgaaaacgtgttcga	
	HR-ForHu	gataacgaattcggttactccaccagagttgttgacttagtcga acacgttttcaagaacggtgacggtgctggttaat	<i>pFA6a-link-yoEGFP-Kan</i>
	HR-RevHu	taatcagttaaaaaagaaaaaggacaaatccttttttag aattattttgactaattcgatgaattcgagctcgtt	
	H2-TDH3-Hu1kb-For	aacgagctcgaattcatcgaattagtcaaaaataattctaaaa aagg	<i>H. uvarum</i> CLIB3221
	H2-TDH3-Hu1kb-Rev	cactagtggatctgatatcaatataaaaagtttaagaataaaa acga	
pFA6-TDH3.1kb.Sb-GFP-hph	pFA6-TDH3-Sb1kb-For	ggagccgacgaggtcacaatgatcagatccactagtggc ct	<i>pFA6-GFP-hphMX</i>
	pFA6-TDH3-Sb1kb-Rev	ccgaaaccgttaataccaacgatccgtcgacctgcagcgt	
	H1-TDH3-Uni1kb-For	acgctgcaggtcgacggatcagttgctattaacggttcgg	<i>S. bacillaris</i> CLIB3147
	H1-TDH3-Sb1kb-Rev	attaaccagcaccgtcaccgtccttcttgcaatcaaga	
	HR-ForSb	aacgagttcggttactctgccgtgttgacctctgtcttga ttccaagaaggacggtgacggtgctggttaat	<i>pFA6-GFP-hphMX</i>
	HR-RevSb	agaatcaactacttagagtactactaaaagttggacaacata gatatttcaactgctcgatgaattcgagctcgtt	
	H2-TDH3-Sb1kb-For	aacgagctcgaattcatcagacagtttgaacatatctatgtt tcc	<i>S. bacillaris</i> CLIB3147
	H2-TDH3-Sb1kb-Rev	cactagtggatctgatatcatttggacctcgtcggtcc	

Supplementary Table 2 (continued): Primer list for plasmid construction

Plasmide name	Primer name	Sequence (5'→3')	Template DNA
pFA6-TDH3.1kb.Td-GFP-Nat	pFA6-TDH3-Td1kb-For	ccaatgaagcataagaataatgatatcagatccactagtggcct	pFA6-GFP-NATMX
	pFA6-TDH3-Td1kb-Rev	ccgaaaccgttaatagcaatgatccgtcgacctgcagcgt	
	H1-TDH3-Uni1kb-For	acgtgcaggtcgacggatcagttgctattaacggtttcgg	<i>T. delbrueckii</i> CLIB3069
	H1-TDH3-Td1kb-Rev	attaaaccagcaccgtcaccagcagaggcaacgtttcaa	
	HR-ForTd	gacaacgaatacggttactctaccagagttgtcgacttgggtgaacacgttgctctgtggtgacggtgctggtttaat	pFA6-GFP-NATMX
	HR-RevTd	taaaacatgtcattaactaaaagtgaaaaagcttgaaaactctttctcaactaattcattcgatgaattcgagctcgtt	
	H2-TDH3-Td1kb-For	aacgagctcgaattcatcgaatgaattagttgagaagagt	<i>T. delbrueckii</i> CLIB3069
	H2-TDH3-Td1kb-Rev	cactagtggatctgatcatattattcttatgcttcattgga	

Bold nucleotides: sequence homologous to the template DNA

Supplementary Table 3: Primers list for cassette amplification

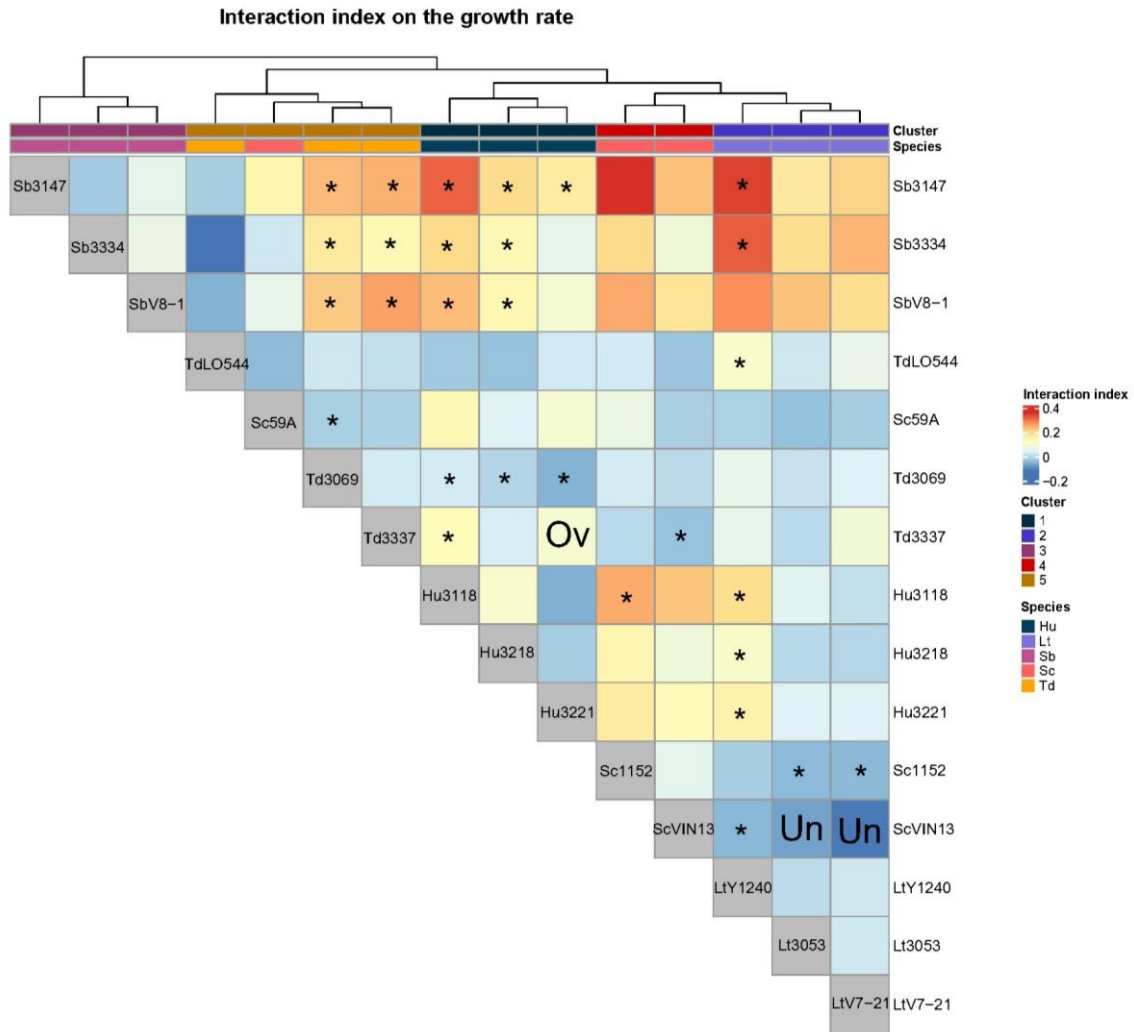
Target species	Primer name	Sequence (5'→3')
<i>S. cerevisiae</i>	HR-ForSc	GACAACGAATACGGTACTCTACCAGAGTTGTCGACTTGTTGAACACGTTGCCAAGGCTggtgacggtgctggtttaat
	HR-RevSc	CTAAGTCATAAAGCTATAAAAAGAAAATTTATTTAAATGCAAGATTTAAAGTAAATTCACtcgatgaattcgagctcgtt
<i>L. thermotolerans</i>	HR-ForLt	GACAACGAGTACGGTACTCTACCAGAGTTGTCGACTTGTTGAGCACGTCGCCAGCGCCggtgacggtgctggtttaat
	HR-RevLt	TATCAAGTCGTTAGATTTTCGTTATAAAAAATGTCTTACGTAAAAATGTGTATCACGGAGTtcgatgaattcgagctcgtt
<i>T. delbrueckii</i>	K7-HR-TDH3.1kb-Td-For	ATTGCTATTAACGGTTTCGGT
	K7-HR-TDH3.1kb-Td-Rev	TTATTCTTATGCTTCATTGGAT
<i>S. bacillaris</i>	K7-HR-TDH3.1kb-Sb-For	GTTGGTATTAACGGTTTCGGTC
	K7-HR-TDH3.1kb-Sb-Rev	TTTGTGACCTCGTCGGCTCC
<i>H. uvarum</i>	K7-HR-TDH3.1kbHu-For	GTTTCCATTAACGGTTTCGG
	K7-HR-TDH3.1kbHu-Rev	ATATAAAAAGTTTAAGAAATAAACGA

UPPERCASE: Sequence homologous to integration locus, **bold nucleotides: Sequence homologous to plasmid**

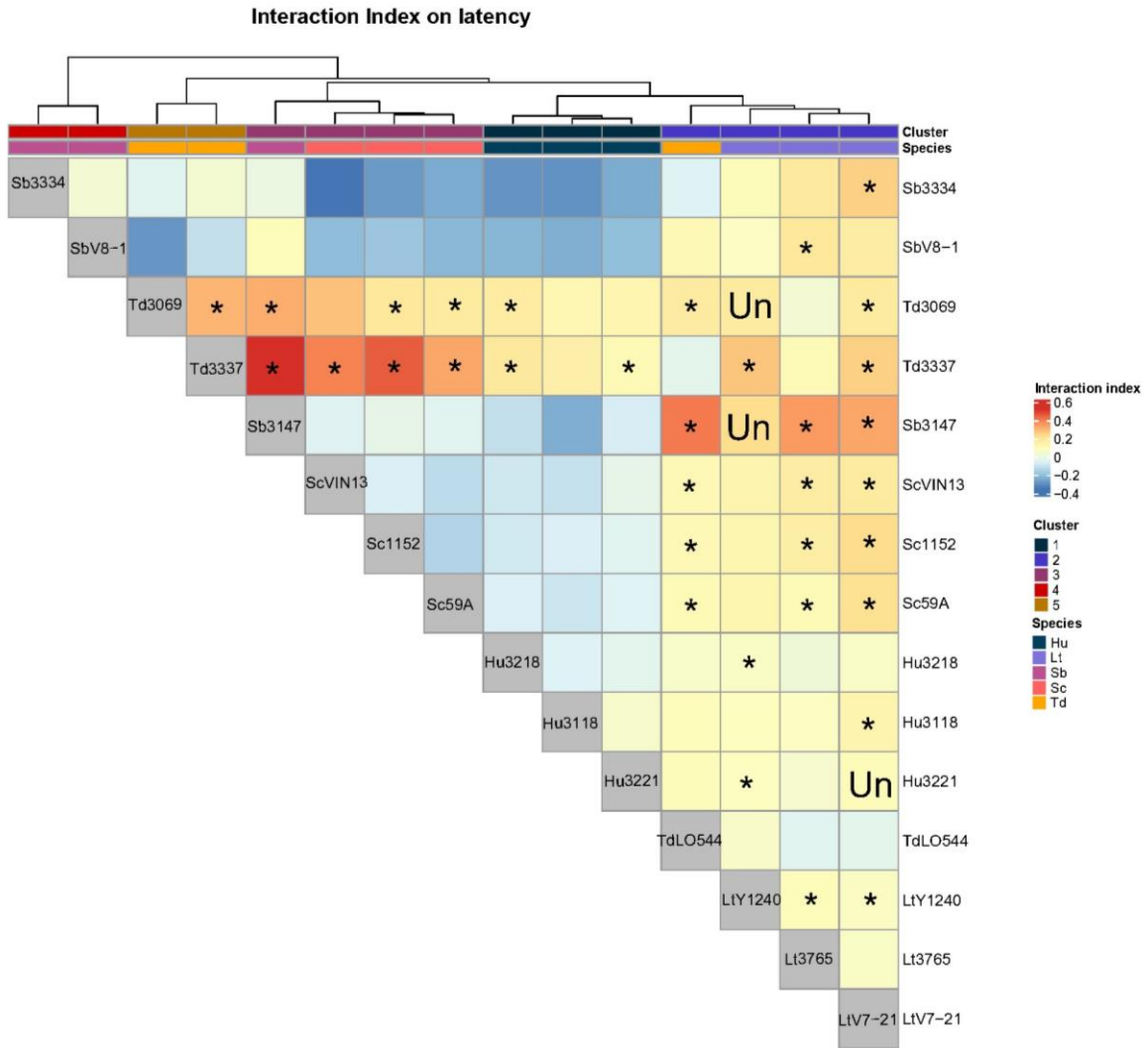
Supplementary Table 4: Primer list and PCR conditions for checking the integration at the locus

Target species	Primer name	Sequence (5'→3')	Primer pair	PCR cycle*
Cassette - universal	C	acagtcacatcatgccctg		
	D	cacacctctaccggcagatc		
<i>S. cerevisiae</i>	A-Hu	GGTATGGCTTTCAGAGTCCCA	A-Hu + C	95°C – 5 min [95 °C – 30 sec 55 °C – 30 sec 72 C – 1 min 30] x30 72°C – 5 min
	B-Sc	TCAGAATCGTTATCCTGGCGG	B-Sc + D	95°C – 5 min [95 °C – 30 sec 50 °C – 30 sec 72 C – 2 min] x30 72°C – 5 min
<i>L. thermotolerans</i>	A-Hu	GGTATGGCTTTCAGAGTCCCA	A-Hu + C	95°C – 5 min [95 °C – 30 sec 55 °C – 30 sec 72 C – 1 min 30] x30 72°C – 5 min
	B-Lt	GAGGAGGTGAAGGTGCAGAG	B-Lt + D	95°C – 5 min [95 °C – 30 sec 57 °C – 30 sec 72 C – 2 min] x30 72°C – 5 min
<i>T. delbrueckii</i>	A-Td-verif-1kb	TAGATGGTGTGCGTGCAATG	A-Td-verif-1kb + C	95°C – 5 min [95 °C – 30 sec 58 °C – 30 sec 72 C – 3 min] x30 72°C – 6 min
	B-Td-verif-1kb	GCTGGCTACCGTTATTGTGG	B-Td-verif-1kb + D	95°C – 5 min [95 °C – 30 sec 58 °C – 30 sec 72 C – 3 min] x30 72°C – 6 min
<i>S. bacillaris</i>	A-Sb-verif-1kb	CACAACTAACACCGTGGCA	A-Sb-verif-1kb + C	95°C – 5 min [95 °C – 30 sec 58 °C – 30 sec 72 C – 3 min] x30 72°C – 6 min
	B-Sb-verif-1kb	TTGTGTTAGCCTGAAACCGC	B-Sb-verif-1kb + D	95°C – 5 min [95 °C – 30 sec 58 °C – 30 sec 72 C – 3 min] x30 72°C – 6 min
<i>H. uvarum</i>	A-Hu-verif-1kb	ATGACACACCACCTCATGT	A-Hu-verif-1kb + C	95°C – 5 min [95 °C – 30 sec 58 °C – 30 sec 72 C – 3 min] x30 72°C – 6 min
	B-Hu-verif-1kb	TGCTCTCGTGACAGTCATTG	B-Hu-verif-1kb + D	95°C – 5 min [95 °C – 30 sec 60 °C – 30 sec 72 C – 3 min] x30 72°C – 6 min
Cassette - universal	C	acagtcacatcatgccctg		
	D	cacacctctaccggcagatc		

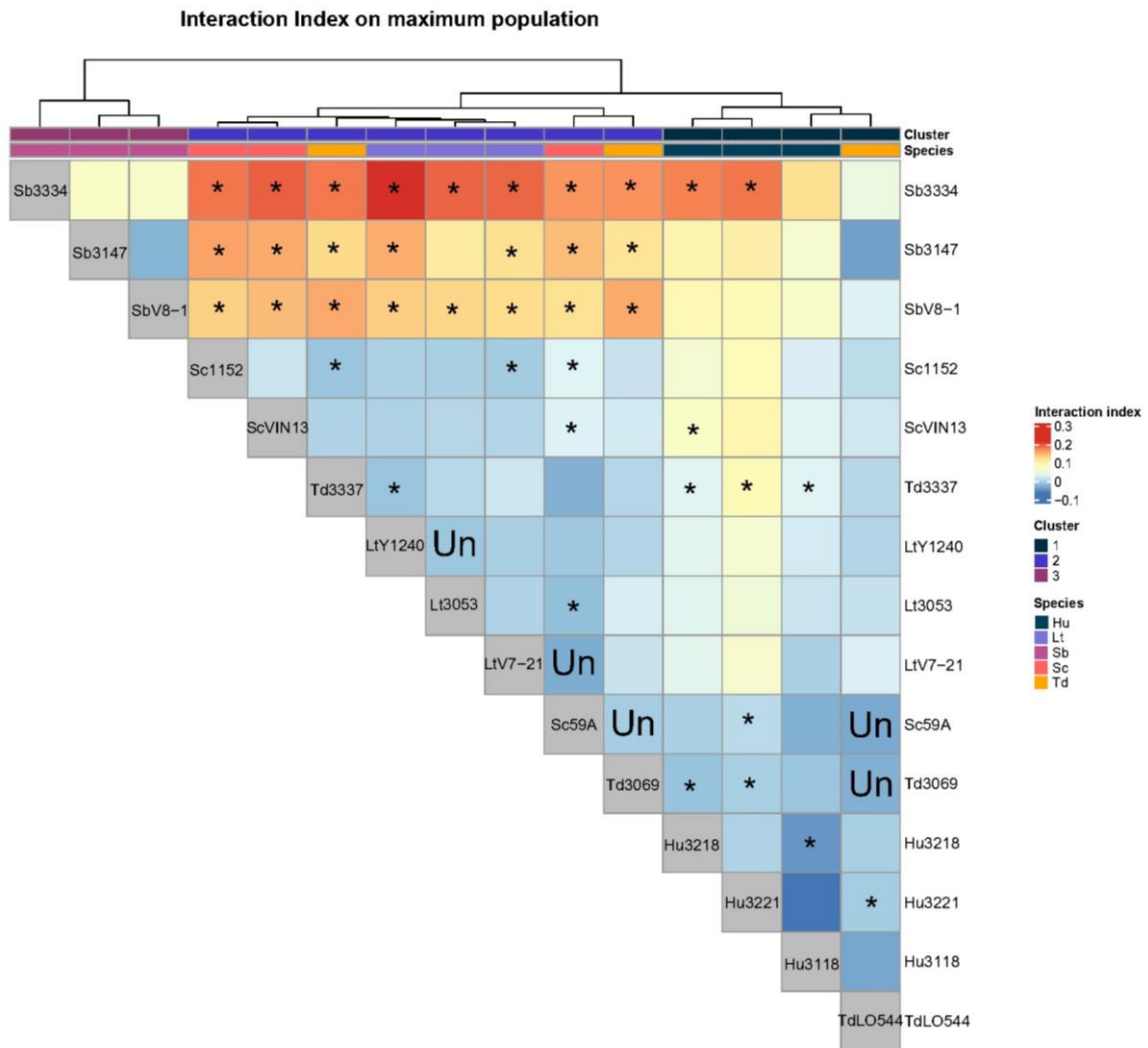
* Polymerase used for all amplifications: Taq Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Ref ep0402)



Supplementary Figure 1: Heatmap of the growth rate (r): positive index means a higher growth rate so a positive interaction. * denotes cocultures whose growth rate is significantly different from the growth rate of both monocultures. Un denotes underyielding (latency time significantly longer than both monocultures), Ov denotes overyielding.



Supplementary Figure 2 : Heatmap of the latency index: positive index means a longer latency time so probably related to negative interactions. * denotes cocultures whose latency is significantly different from the average latency of both monocultures. Un denotes underyielding (latency time significantly longer than both monocultures). No overyielding was observed for the latency.



Supplementary Figure 3: Heatmap of the maximum population (=MaxOD600): positive index means a higher maximum population so related to positive interactions. * denotes cocultures whose maximum population is significantly different from the average maximum population of both monocultures. Un denotes underyielding (latency time significantly longer than both monocultures)

Chapitre 2 :

**Importance de la souche lors de
fermentations en consortia**

Dans le premier chapitre, nous avons montré l'effet prédominant des espèces versus souches dans la détermination du type d'interaction en co-culture. Nous avons donc voulu dans ce deuxième chapitre étendre cette question au niveau d'un consortium comportant plusieurs espèces. L'objectif étant donc de savoir si les modifications de compositions de souches, dont le phénotype en mono-culture varie souvent de manière intraspécifique, pouvaient influencer les fonctionnalités fermentaires d'un consortium.

Lors de ces expérimentations, nous avons suivi la fermentation œnologique de neuf consortia générés aléatoirement, et qui incluaient tous sept espèces dans des proportions fixes visant à mimer celles communément rencontrées dans les moûts de raisin. Chacun de ces écosystèmes avait une composition unique de souches, avec pour chacune des sept espèces trois souches possibles. Les espèces ainsi que leur fréquence ont été choisies à partir d'un travail bibliographique. Chaque consortium, ainsi que chaque souche, ont été caractérisés par un ensemble de paramètres cinétiques et métaboliques lors de la fermentation. De plus, pour chacun de ces écosystèmes, nous avons suivi et essayé de déterminer l'impact de la composition en souche sur les fonctionnalités de l'écosystème.

Dans l'ensemble, nous avons constaté que les variations des mono-cultures étaient principalement dues à l'espèce, mais nous avons également observé des variations intraspécifiques. Au niveau des consortia, nos résultats suggèrent que la modification de la composition des souches n'entraîne que de faibles changements dans le processus de fermentation, mais a un impact sur les concentrations finales de certains métabolites. Cependant, la plupart du temps, les résultats des consortia n'ont pas pu être liés à une souche spécifique ou corrélés aux résultats des mono-cultures. Seules deux souches impactent significativement le phénotype des consortia. Des concentrations élevées d'acide lactique ont été observées dans les consortia avec la souche de *L. thermotolerans* S6-47 ayant le rendement le plus élevé en acide lactique, tandis qu'un taux maximal de CO₂ et un taux de glycérol plus faible ont été observés dans les consortia avec *M. pulcherrima* V4-22.

Il est aussi important de noter la possibilité d'erreurs expérimentales dans la détermination de la dynamique des populations pour les consortia 1 et 2. En effet, ces consortia qui appartenaient au même bloc expérimental se distinguent nettement de tous les autres en terme de dynamique des populations. Nous avons prévu de reproduire ces expérimentations d'ici la soutenance.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus avec les consortia confirment les conclusions du premier chapitre, démontrant que c'est effectivement la composition en espèces qui a un impact plus significatif sur les caractéristiques fermentaires que la composition en souches.

How do strains affect the fermentation process and microbial dynamic in a wine yeast consortium?

Authors: Eléonore Pourcelot¹, Thérèse Marlin¹, Virginie Galeote¹, Thibault Nidelet¹

Affiliation: ¹ SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

Abstract

Wine fermentation is a dynamic process involving diverse microorganisms, including yeasts and bacteria. Non-*Saccharomyces* (NS) yeast species, such as *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Starmerella*, and *Pichia*, play a role in early fermentation before *Saccharomyces cerevisiae* takes over. Recent interest has focused on exploiting this microbial diversity to improve wine quality. Synthetic microbial consortia have emerged as valuable tools for studying microbial communities, offering a compromise between natural complexity and controlled analysis. In this study, we explored how variations in strain composition affects the behavior of a wine yeast consortium. We designed nine unique consortia by mixing strains from six species, each with three different strains, and included a *Saccharomyces cerevisiae* strain with a fluorescent label. Subsequently, we conducted enological fermentation with these consortia. Our initial focus was to assess the inherent variability among various strains belonging to each yeast species. The study's results indicated that, while the primary factor influencing variations was the yeast species itself, there was also evidence of variability within the same species. At the consortium level, altering strain composition led to minor changes in fermentation but affected some metabolite concentrations. However, these changes showed a weak connection to the presence of a specific strain. The dominance of *S. cerevisiae* in consortia and the unique dynamics of wine fermentation may limit the discernible effects of strain diversity. This study highlights the complex interplay of strain interactions within consortia and emphasizes the significant role of strain diversity in shaping the fermentation process, requiring further research to elucidate this complex microbial dynamic in wine production.

Introduction

Wine fermentation is a complex process involving various microorganisms, especially yeasts and bacteria that are initially present on the grape must and in the winery. Diverse non-*Saccharomyces* (NS) yeast species belonging to the *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Starmerella*, and *Pichia* genera can be found during the early phase of fermentation before *Saccharomyces cerevisiae* takes over during later phases (Fleet 2003; Drumonde-Neves *et al.* 2021). Recently, there has been an increasing interest in harnessing this natural diversity to improve sensory qualities of wine and deciphering the drivers of the community dynamics.

During the last few years, synthetic microbial consortia have been established as a powerful tool to study microbial communities since they are a trade-off between the complexity of natural communities and the detailed analysis of monocultures (De Roy *et al.* 2014; Blasche *et al.* 2017). Synthetic consortia have been used to improve industrial processes (Shong *et al.* 2012) as well as explore ecological questions such as drivers of community assembly (Xenophontos *et al.* 2021) or the impact of environmental stress (Piccardi *et al.* 2019).

Compared to other ecological niches like soil or gut microbiota, wine yeast diversity is relatively reduced and most species are culturable which make them easy to use in simplified laboratory conditions (Blasche *et al.* 2017; Conacher *et al.* 2021). Several model yeast consortia have already been designed using wine isolates. These consortia were composed of different species (Bagheri *et al.*, 2017) or different strains of the same species (Schmidt *et al.* 2020). However, few studies have explored different strains and species for the design of model consortia. Moreover, while the choice of species is usually made clear, the choice of strain is often left unexplained. Yet, extensive research has shown that intraspecific diversity is present both at the genetic and phenotypic level in yeast species, such as *S. cerevisiae* (Camarasa *et al.* 2011), *Torulaspota delbrueckii* (Silva *et al.* 2022; Silva-Sousa *et al.* 2022), *Lachancea thermotolerans* (Hranilovic *et al.* 2018) or *Brettanomyces bruxellensis* (Harrouard *et al.* 2022). Strain level has also been identified as a factor that may influence population dynamics in cocultures with *S. cerevisiae* (Wang *et al.* 2016; Onetto *et al.* 2021) even though species level might be prevailing (Pourcelot *et al.* 2023). Thus, it appears of importance to study the actual impact of strains in model consortia of different ecosystems.

In this study, we investigated how variations in strain composition could affect the behaviour of a wine yeast consortium. To achieve this goal we randomly designed nine distinct consortia, each comprising the same set of species while utilizing different combinations of strains. These strains were selected from a pool of three for each of the six NS species (*Hanseniaspora uvarum*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kudriavzevii*, *Starmerella bacillaris* and *Torulaspora delbrueckii*). Additionally, we included one strain of *S. cerevisiae*. We then performed enological fermentation for each consortium and each strain and examined the intra- and interspecific variability of each strain as well as the impact of strain composition at the consortium level.

Material and methods

a. Strains

In this study, seven wine yeasts species were used: *Hanseniaspora uvarum*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Starmerella bacillaris*, and *Torulaspora delbrueckii*. For each non-*Saccharomyces* species, three strains isolated from the Languedoc region in France were included, as shown in **Table 1**. Strains were kept at -80°C in yeast peptone dextrose YPD (1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% glucose) supplemented with 20% of glycerol before being streaked on YPD agar and incubated at 28°C.

b. Fluorescent *S. cerevisiae* construction

The *S. cerevisiae* strain was tagged with mCherry in fusion to the *TDH3* gene using the lithium acetate transformation protocol (Güldener *et al.* 1996). The cassette containing the mCherry and KanMX genes was amplified from the pFA6a-link-yomCherry-Kan ordered from AddGene (44903; Lee *et al.* 2013). Primers used for amplification and verification of the integration are the same as in Pourcelot *et al.* (2023). To ensure innocuity of the transformation, growth of the transformed strain was compared to that of the WT strain in YPD and synthetic grape must in microplate (ClarioStar) at 28°C during 24 h, with automatic measures of the optical density at 600nm (Supplementary Figure 2).

Table 1: List of yeast strains used in this study

Species	Strain name	Code	Genotype	Provider
<i>S. cerevisiae</i>	M2ONO800_1A-mCherry	Sc4798	<i>TDH3-mCherry-kanMX</i>	This study
<i>H. uvarum</i>	CLIB3218	Hu3218		CIRM
	CLIB3221	Hu3221		CIRM
	CLIB3118	Hu3118		CIRM
<i>L. thermotolerans</i>	CLIB3053	Lt3053		CIRM
	PY V7-21	LtV7-21		SPO, unpublished
	PY S6-47	LtS6-47		SPO, unpublished
<i>M. pulcherrima</i>	CLIB3329	Mp3329		CIRM
	CLIB3324	Mp3324		CIRM
	PY V4-22	MpV4-22		SPO, unpublished
<i>P. kudriavzevii</i>	CLIB3247	Pku3247		CIRM
	CLIB3252	Pku3252		CIRM
	PY S6-12	PkuS6-12		SPO, unpublished
<i>T. delbrueckii</i>	CLIB3069	Td3069		CIRM
	CLIB3337	Td3337		CIRM
	CLIB3152	Td3152		CIRM
<i>S. bacillaris</i>	CLIB3147	Sb3147		CIRM
	CLIB3334	Sb3334		CIRM
	PY V8-1	SbV8-1		CIRM

c. *Experimental fermentations*

Nine consortia were randomly designed using a hypercube latin algorithm (Helton et Davis 2003) so that each consortium includes all the seven species but with different strains for every species and so that each of the three selected strains are included in three different consortia. The initial abundance of each species was chosen to mimic abundance found in natural must (**Table 2**). Additionally, strains were tested in monoculture fermentations.

Table 2: Strain combination of the nine studied random consortia of seven yeast species. For the different species, inoculation was done using different initial relative abundance chosen to resemble natural grape must.

Species	Consortia									Initial Relative abundance (% of 10 ⁶ CFU/mL)
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	
<i>H. uvarum</i> WT	Hu3118	Hu3221	Hu3218	Hu3118	Hu3221	Hu3218	Hu3221	Hu3118	Hu3218	35%
<i>M. pulcherrima</i> WT	MpV4_22	MpV4_22	Mp3329	Mp3329	Mp3324	MpV4_22	Mp3324	Mp3329	Mp3324	20%
<i>P. kudriavzevii</i> WT	Pku3252	PkuS6_12	Pku3247	Pku3252	Pku3247	Pku3252	PkuS6_12	PkuS6_12	Pku3247	5%
<i>S. bacillaris</i> WT	Sb3334	Sb3147	SbV8_1	Sb3147	SbV8_1	Sb3334	SbV8_1	Sb3334	Sb3147	20%
<i>T. delbrueckii</i> WT	Td3069	Td3337	Td3069	Td3152	Td3152	Td3337	Td3152	Td3069	Td3337	5%
<i>L. thermotolerans</i> WT	LtV7_21	Lt3053	Lt3053	LtV7_21	LtS6_47	LtS6_47	Lt3053	LtS6_47	LtV7_21	5%
<i>S. cerevisiae</i> mCherry	Sc4798	Sc4798	Sc4798	Sc4798	Sc4798	Sc4798	Sc4798	Sc4798	Sc4798	10%

All fermentations were run in pasteurized synthetic grape must (SGM) prepared according to Bely et al., (1990) with 100 g/L of glucose, 100 g/L of fructose, 425 mg/L of yeast assimilable nitrogen (as a mixture of amino-acids and ammonium) and a pH of 3.3. Before inoculation, fermenters were aerated by bubbling air then synthetic grape must was supplemented with 5 mg/L of phytosterols (β -sitosterols, Sigma) and closed with a fermentation lock.

Strains were propagated in YPD at 28°C for 17 hours, then an aliquot was diluted by 1:50 in SGM425 and incubated at 28°C for 24 hours. Cell concentration of cultures was estimated by flow cytometry. The required cell volume of each strain to obtain the target initial relative abundance (Table 2) was transferred to a 50 mL tube and washed with physiological water before being inoculated. Monocultures and consortia were all inoculated with a total cell concentration of 10⁶ cells/mL.

d. Fermentation conditions

Monocultures were run in 300 mL fermenters filled with 250 mL of SGM. Fermenters were placed on magnetic stirring plates (260 rpm). Fermentation kinetics were followed by automatic weighing that evaluated CO₂ loss. Weight of fermenters were measured every 40 min thanks to a robotic arm (LabServices, Breda, Netherlands) that moved the fermenters from their location on the stirring plates to a precision balance. Both the *S. cerevisiae* WT and Sc4798 strains were tested in monocultures to check that the transformation had no impact on the transformation (Supplementary Figure 3).

Consortia were run in 1.2 L fermenters filled with 1L of SGM. Fermenters were placed on magnetic stirrers, that is itself placed onto a precision balance. Fermentation kinetics were followed by automatic weighing every 20 min.

For both monocultures and consortia, fermentation kinetics could be followed online thanks to an internally developed software that calculated the total production of CO₂ (in g/L), the rate of CO₂ production (in g/L/h).

All fermentations were run at 24 °C in triplicates.

e. *Metabolites analysis*

Extracellular metabolite and sugar concentrations (ethanol, glycerol, acetic acid, lactic acid, pyruvic acid, α-ketoglutaric acid, glucose, and fructose) were determined by high-performance liquid chromatography at the start and at the end of fermentation following the method described by Deroite *et al.* (2018). Samples were centrifuged 5 min at 4415 g at 4°C to get rid of cells. Supernatant aliquots were kept at -20°C before being diluted with 2.5 mM sulfuric acid (H₂SO₄, Merck, Darmstadt, Germany) at 1:6, and centrifuged again at 13000 rpm for 5 min. Diluted samples were kept at -20°C until analysis. HPLC were run on the HPLC 1290 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a Phenomenex Rezex ROA ion exclusion column (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) at 60°C. Fermentation samples were analysed with technical duplicates.

To compare the different strains regardless of their sugar consumption, yield was calculated for each metabolite using the following formula:

$$Y_{\text{metabolite}} = \frac{\text{Final metabolite concentration (g/L)}}{\text{Initial sugar concentration (g/L)} - \text{Final sugar concentration (g/L)}} \quad (1)$$

f. *Population dynamic*

Population dynamic was monitored by flow cytometry with the Attune NxT Thermofisher Flow Cytometer. One milliliter of cells was washed with 1 mL of PBS (130 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, pH 7.4; Sigma, Saint-Louis, MO, USA) after centrifugation at 4415 g for 5 min. Where necessary, samples were diluted in PBS before reading so that the cell concentration was approximately 5.10⁵ to 1.10⁶ cells/mL. Total cell count was measured with the FSC and SSC channels (488 nm laser, 488/10 filter). To restore fluorescence of mCherry in *S. cerevisiae* cells, samples were kept at 4°C for 24 h. Then, the *S. cerevisiae* population was monitored on the YL2 channel (561 nm laser, 600DLP-620/15). Dead cells population was assessed after staining cells with 1µg/mL Propidium Iodide (PI; stored at 4°C protected from light; Calbiochem) for 10 min at room temperature and differentiated

from live cells and fluorescent *S. cerevisiae* cells on the YL2 channel (561 nm laser, 600DLP-620/15 filters). Dead cells were separated from *S. cerevisiae* cells since dead cells had higher fluorescence intensity and no overlap of populations were found between dead NS and *S. cerevisiae* (data not shown).

g. *Data analysis*

For all fermentation, we determined a set of 11 parameters. They included 5 kinetics parameters, namely latency (time needed to reach 5 g/L of CO₂), time of fermentation (tF, time when CO₂ rate < 0.02 g/L/h), maximum CO₂ rate (Vmax), time to reach Vmax (tVMax), maximum CO₂ - and 6 metabolic parameters, namely the yields of ethanol, glycerol, and acetic, α -ketoglutaric, lactic, and pyruvic acids.

For the 6 metabolic parameters, the species and strain effect were assessed with a nested ANOVA since strains were unique to each species creating a nested structure of data, and as such, considered as random effect. The nested ANOVA was run using the following model:

$$Y_i = \alpha + \beta Species_i + b_i Strain_i + \varepsilon_i \quad (2)$$

Where α = intercept, Y_i : growth parameter, $\beta Species_i$ fixed term related to species, $b_i Strain_i$ term related to the strain effect, since species and strains constitute hierarchical variables. When a significant strain effect was found, a *posthoc* Tukey test was performed within each species.

Consortia fermentation parameters were compared with ANOVA, without including *S. cerevisiae* monoculture.

All statistical analyses were run with the R software (R Core Team 2022) and the following packages: *tidyverse* (Wickham *et al.* 2023), *stats*, *lmerTest* (Kuznetsova *et al.* 2017), *agricolae* (Mendiburu 2010).

Results

The focus of this study was to evaluate how diversity in strain phenotype could impact the result of fermentation at the consortium level. Specifically, our aim was to investigate whether the behaviour of the seven-species consortia related to signatures of monoculture fermentation results.

Selection of the seven species and choice of their initial abundance. To design the consortium, yeast species and their initial abundance were chosen from a literature review. The yeast species most frequently isolated during winemaking in 18 articles were selected, and their initial abundance was determined from the average of the initial abundance found in a subselection of 11 articles (Combina *et al.* 2005; Hierro *et al.* 2006; Di Maro *et al.* 2007; Zott *et al.* 2008; Ocón *et al.* 2010; Baffi *et al.* 2011; Díaz *et al.* 2013; Ghosh *et al.* 2015; Maturano *et al.* 2015; Sternes *et al.* 2017; Morgan *et al.* 2019; Mandakovic *et al.* 2020; Mateus *et al.* 2020). These articles needed to include at least one sampling without inoculation and without enrichment steps, and the identification had to be at the species level. They encompassed different world regions and winemaking practices (grape variety, conventional and organic, etc). Despite the clear influence of these factors on yeast diversity, we found little relationship between the regions and practices with the presence of specific species, which is in line with the conclusions of a recent meta-analysis (Drumonde-Neves *et al.*, 2021). Among the most frequent species, we decided to select only one species per genera with the assumption that it might increase phenotypic diversity and the overall usefulness of our model consortium. Thus, the seven following species were selected: *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *M. pulcherrima*, *S. bacillaris*, *T. delbrueckii*, *P. kudriavzevii* and *L. thermotolerans* (Supplementary Figure 1A). Then, the initial abundance for each species was determined from their natural initial abundance in must and early stages of fermentation (Supplementary Figure 1B). The average relative abundance in must of *H. uvarum*, *M. pulcherrima* and *S. bacillaris* were higher than other species, so their inoculation abundance was chosen higher in the consortium (30%, 20%, 20% respectively). On the contrary, *T. delbrueckii*, *P. kudriavzevii*, and *L. thermotolerans* have a very low initial abundance, and were inoculated with an initial relative abundance of 5% to make inoculation and numbering easier, and *S. cerevisiae* abundance was chosen at 10% (**Table 2**). For each non-*Saccharomyces* species, three strains were selected from the lab collection. The strains were isolated from Sauvignon or Viognier grape variety, from different location in the Languedoc region. They are in the public domain and can thus be shared to the scientific community.

a. Initial inter- and intraspecific phenotypic diversity

To assess the initial phenotypic diversity between the studied strains, fermentation kinetic, and metabolite production were followed in single strain fermentations carried out in 250 mL fermenters in synthetic must (425 mg/L YAN, 200 g/L sugar).

Species level structures the phenotypic diversity of fermentations. We first performed a principal component analysis (PCA, Figure 1) to obtain an overview of the inter- and intraspecific diversity of monocultures of non-*Saccharomyces* species. The PCA carried out for this study covered a complete set of 12 variables. These variables encompassed both production yields of the main metabolites of the central carbon metabolism (yields in acetic acid, ethanol, glycerol, lactic acid, pyruvic acid, and α -ketoglutaric acid) and kinetic parameters (time elapsed before the fermentation stops, yield of CO₂, maximum CO₂ production rate, time of CO₂ maximum production rate). Yields were used to make it easier to compare strains regardless of their consumptions of sugars. For the sake of comparison, *S. cerevisiae* was projected onto the same PCA space but was not included in the PCA calculation. The first two axes of the PCA explained respectively 50.5 % and 18.6 % of the variance for a total of 69.1 % (Figure 1A).

The great interspecific diversity between the six studied non-*Saccharomyces* is highlighted by the proximity of strains of the same species (Figure 1B). When projected onto the PCA plot, *S. cerevisiae* clustered with *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans*, driven by their fermentative ability (high V_{max} and short latency). This is also shown in Figure 2, which presents the detailed values of fermentation kinetics parameters. Only *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans* strains demonstrated a latency time less than 25 hours, and a maximum CO₂ production rate (V_{max}) between 1 and 1.5 g/L/h while *S. cerevisiae* had a V_{max} of 2.2 ± 0.0021 g/L/h. In addition, as indicated in Supplementary Figure 2, *T. delbrueckii* strains showed the lowest amount of residual sugars and *T. delbrueckii* CLIB3152 even reached dryness within 400h. *L. thermotolerans* stopped fermentation early (less than 170 h, Figure 2) but left between 35 and 54 g/L of residual sugars. *S. bacillaris* strains formed a different cluster, characterized by a low ratio of consumed glucose to consumed fructose, as well as high yield in pyruvic acid and glycerol (Figure 1). Moreover, *S. bacillaris* strains showed the longest latency time (between 52 and 56 hours) and lowest V_{max} (between 0.21 and 0.25 g/L/h) (Figure 2). On the PCA analysis, *H. uvarum* strains correlated with a high ethanol yield and to

a lesser extent to the production of acetic acid (Figure 1). Surprisingly, the three strains stopped the fermentation quite early (between 190 and 230 hours). As *H. uvarum* strains also showed low V_{max} (0.32 to 0.41 g/L/h), this species produced the least CO_2 (Figure 2). These results highlight the weak fermentative ability of *H. uvarum*. *M. pulcherrima* and *P. kudriavzevii* clustered at the top half of the PCA plot, likely due to the short time they needed to reach the V_{max} and long fermentation time (Figure 1).

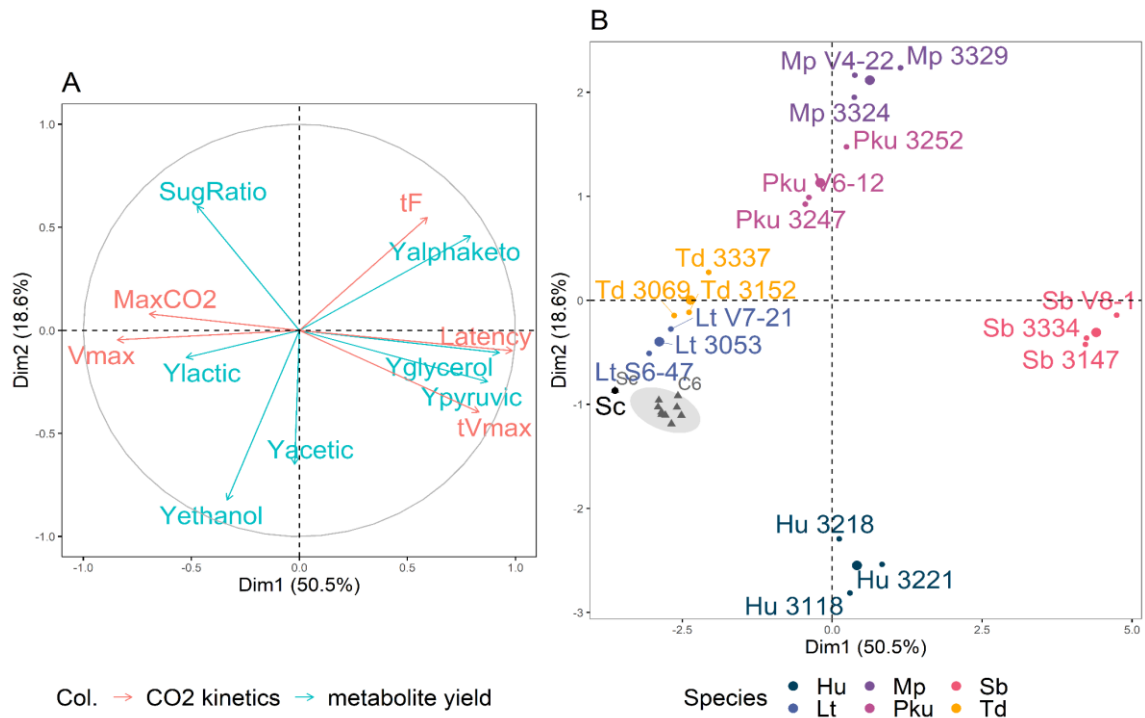


Figure 1: PCA analysis for monoculture fermentation of the 18 non-Saccharomyces strains. **A:** Plot of variables. *Y* stands for yield, *SugRatio* corresponds to the ratio between consumed glucose and consumed fructose, *tF* = time needed to stop fermentation (CO_2 rate < 0.02 g/L/h), *Latency* = time needed to reach 5 g/L of CO_2 , V_{max} = maximum release rate of CO_2 . **B:** Plot of individuals, representing the average of triplicates for each strain. The data of single strain fermentation of *S. cerevisiae* (*Sc*) and consortia (grey triangles) were later projected on the PCA plot, without being considered in the dimension computing. Data were scaled before the PCA. *Hu*: *Hanseniaspora uvarum*, *Lt*: *Lachancea thermotolerans*, *Mp*: *Metschnikowia pulcherrima*, *Pku*: *Pichia kudriavzevii*, *Sb*: *Starmerella bacillaris*, *Td*: *Torulaspora delbrueckii*.

Strong species and strain effect on metabolite yields. The phenotypic variability between species and strains observed on the PCA was further analysed with metabolite yields shown in Figure 3 and Supplementary Table 1. Variations at both species and strain level were evaluated with a nested ANOVA (

Table 3). Analysis of metabolite yields revealed a distinct impact due to species variation ($p\text{-value}_{\text{species}} < 0.05$) for all considered metabolites. Except for ethanol and pyruvic acid yields,

metabolites yields also showed variability at the strain level. Furthermore, some species exhibited unique metabolite production as compared to the other species. For example, only *L. thermotolerans* strains produced significant amount of lactic acid, with a great variations between strains (p-value strain < 0.01,

Table 3) since *L. thermotolerans* LtS6-47, Lt3053, and LtV7-21 had respectively a yield 0.061 ± 0.002 , 0.036 ± 0.002 and 0.022 ± 0.001 g/g of sugar (Figure 3). *M. pulcherrima* and *S. bacillaris* exhibited higher yields in α -ketoglutaric acid, with *M. pulcherrima* Mp3329 having the highest yield ($Y_{\alpha\text{-keto, Mp3329}} = 0.0023 \pm 0.0004$ g/g of consumed sugar) while the other two *M. pulcherrima* strains were around 0.0015 ± 0.0001 g/g of consumed sugar (Figure 3). Pyruvic acid was overproduced by *S. bacillaris* (on average 0.0080 g/g of consumed sugar), Sb3147 being the lowest producer ($Y_{\text{pyruvic, Sb3147}} = 0.0074 \pm 0.0018$). In addition, *H. uvarum* strains were related to high yield of acetic acid, the three strains having significantly different yields ($Y_{\text{acetic, Hu3118}} = 0.0095 \pm 0.0005$, $Y_{\text{acetic, Hu3218}} = 0.0072 \pm 0.0005$, $Y_{\text{acetic, Hu3221}} = 0.0067 \pm 0.0004$). *P. kudriavzevii* strains showed an overall intermediate relative production yield compared to other NS. Hence, despite the limited number of strains included for each species, they displayed a significant inter and intra-specific initial diversity in metabolite production. Additionally, interspecific variability prevailed over the intraspecific variability.

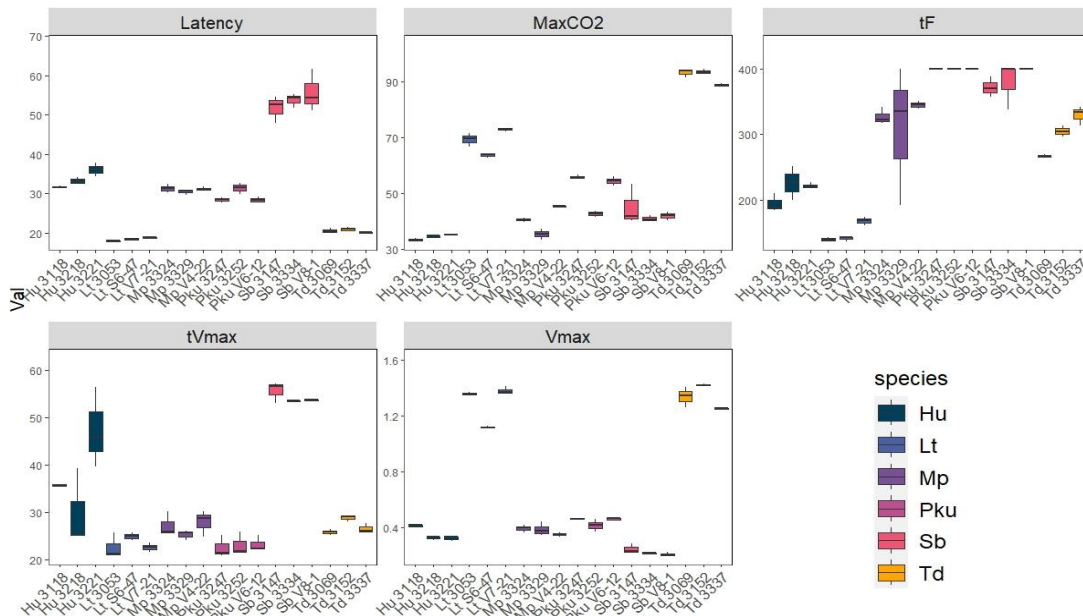


Figure 2: Variability in fermentation kinetics between species and strains. Latency = time needed to reach 5 g/L of CO₂ (in h), MaxCO₂ = total quantity of produced CO₂ (in g/L), tF = time needed to stop fermentation (when CO₂ rate < 0.02 g/L/h, in h), Vmax = maximum release rate of CO₂ (in g/L/h), tVmax = time when Vmax is reached (in h). Hu: Hanseniaspora uvarum, Lt:

Lachancea thermotolerans, *Mp*: Metschnikowia pulcherrima, *Pku*: Pichia kudriavzevii, *Sb*: Starmerella bacillaris, *Td*: Torulaspora delbrueckii.

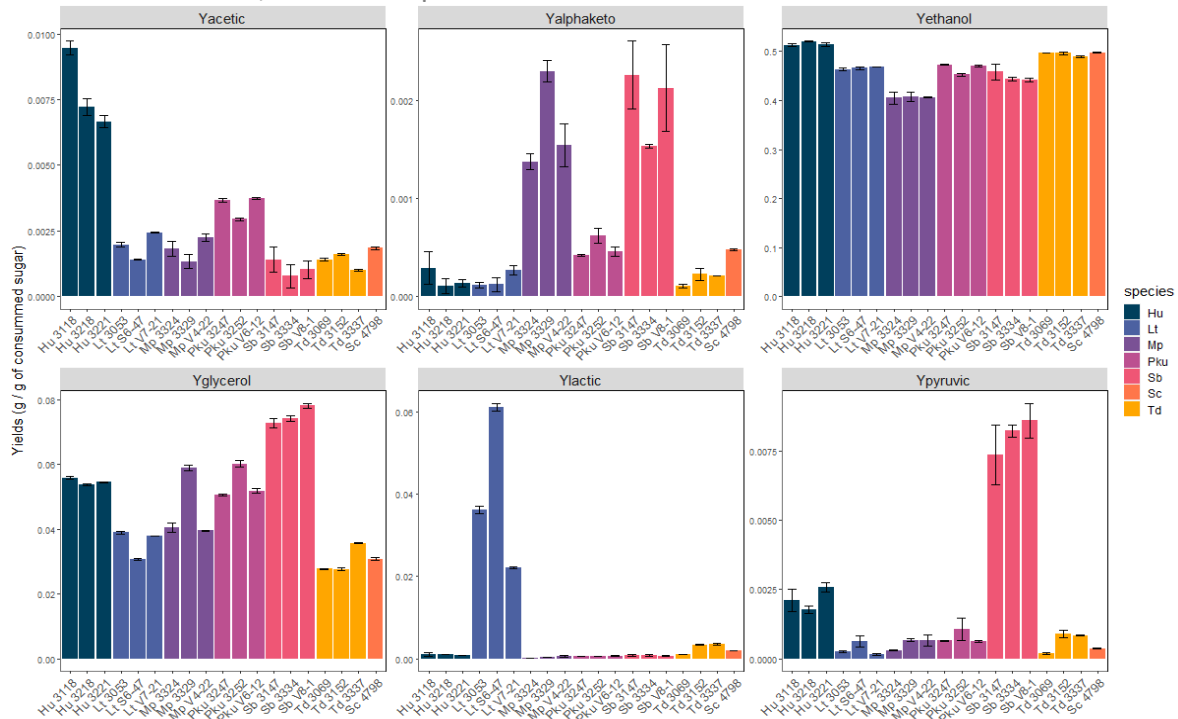


Figure 3: Yield for metabolites at the end of monoculture fermentations. Error bars indicate standard error. *Hu*: Hanseniaspora uvarum, *Lt*: Lachancea thermotolerans, *Mp*: Metschnikowia pulcherrima, *Pku*: Pichia kudriavzevii, *Sb*: Starmerella bacillaris, *Sc*: Saccharomyces cerevisiae, *Td*: Torulaspora delbrueckii.

Table 3: Results from the nested ANOVA performed yields in metabolites production. The species effect was considered as a fixed effect (p -value Species), while the strain effect was considered as a random effect (p -Value Strain)

Parameter	p -value _{Species}	p -value _{Strain}
Yacetic	6,17E-07	1,10E-07
Yalpaketo	2,25E-06	0,014577694
Yethanol	1,54E-09	0,702472256
Yglycerol	0,00000945	5,77696E-21
Ylactic	0,000312	8,40168E-37
Ypyruvic	6,62E-11	0,582572299

b. Fermentation performances of consortia

In order to investigate the influence of the strain composition of a yeast consortium onto the fermentation performances, we designed nine random consortia using a Latin hypercube square method. Consortia were designed ensuring a uniform species composition, with

identical species and initial abundances (Table 2). However, strain composition varied across consortia with each strain present in three of the nine consortia.

As with single strain fermentations, we evaluated the fermentation performance and metabolite production of the nine consortia. When projected onto the PCA computed with single strain fermentation data, the phenotype of all the consortia showed similar profiles and clustered together, close to fermentative species (C1 to C9 grey points, Figure 1). This clustering close to fermentative species is likely related to the presence of *S. cerevisiae* that rapidly dominated the consortia.

Limited effect of strain composition on fermentation kinetics. The overall fermentation process was not impacted by the differences in strain compositions since the time to finish fermentation ($t_F = 151 \pm 18$ h) and the CO₂ yield ($Y_{CO_2} = .466 \pm 0.004$) were similar for all consortia (Figure 4). The CO₂ yields observed in consortia were comparable to those of *S. cerevisiae* monocultures ($Y_{CO_2, sc} = 0.463 \pm 0.003$, p-value = 0.51). However, fermentation times for the consortia were slightly longer compared to *S. cerevisiae* monocultures ($t_{Fsc} = 123 \pm 13$ h, p-value = 0.0034). Regarding latency time, consortia C1 and C7 had the shortest latency time (23 ± 1 h both) and C2 the longest (26 ± 1 h). It should be noted that these time differences are quite minor, and the other consortia did not deviate significantly from these two values. Interestingly, only three consortia (C1, C2 and C6) had a significantly lower maximum CO₂ production rate ($V_{max} = 1.44 \pm 0.07$ g/L/h, p-value = $7.2e-10$). Notably, all three of these consortia contained the *M. pulcherrima* V4-22 strain.

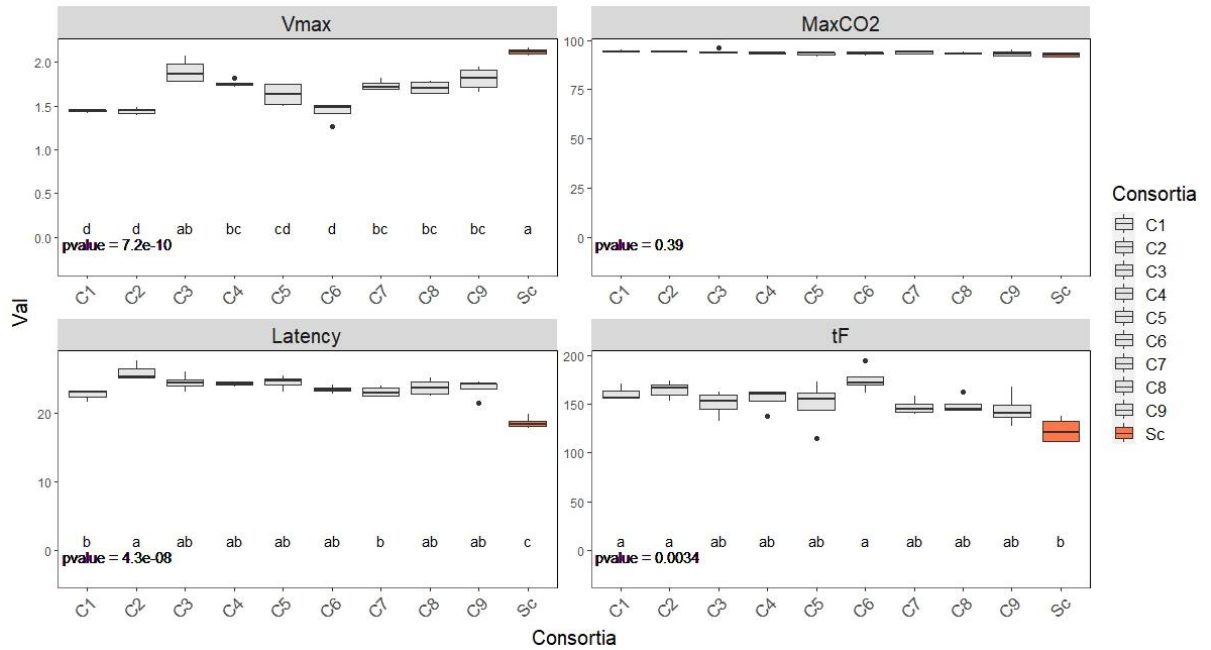


Figure 4: Fermentation kinetics parameters. Latency: time to reach 5g/L of accumulated CO₂. tF: time to stop the fermentation (CO₂ rate < 0.02 g/L/h). Vmax: maximum CO₂ rate. YCO₂: yield in CO₂ (CO₂ produced in g/sugar consumed in g). p-value indicates the result of an ANOVA test run on the nine consortia. Sc is given for comparison purposes and was not included in the statistical analysis.

A few monoculture signatures found in metabolite production at the consortium level.

The final metabolite concentrations at the end of fermentation (after around 180 hours) of consortia and *S. cerevisiae* monocultures are indicated in Figure 5 and Supplementary Table 2. No significant differences were found between consortia for the ethanol concentration (between 100 and 102 g/L), which matches with the absence of strain effect in single strain fermentations for the ethanol yield. On the contrary, the other studied metabolites showed variations across the different consortia, indicating that strain composition of consortia could affect the fermentation outcome. For example, consortia C7 and C9 showed the highest acetic acid concentration (0.352 ± 0.031 g/L), whereas consortium C1 showed the lowest (0.287 ± 0.015 g/L). In the same way, consortia C3 and C6 had respectively the highest and lowest α -ketoglutaric acid concentrations ($0,033 \pm 0.010$ g/L; 0.018 ± 0.002 g/L).

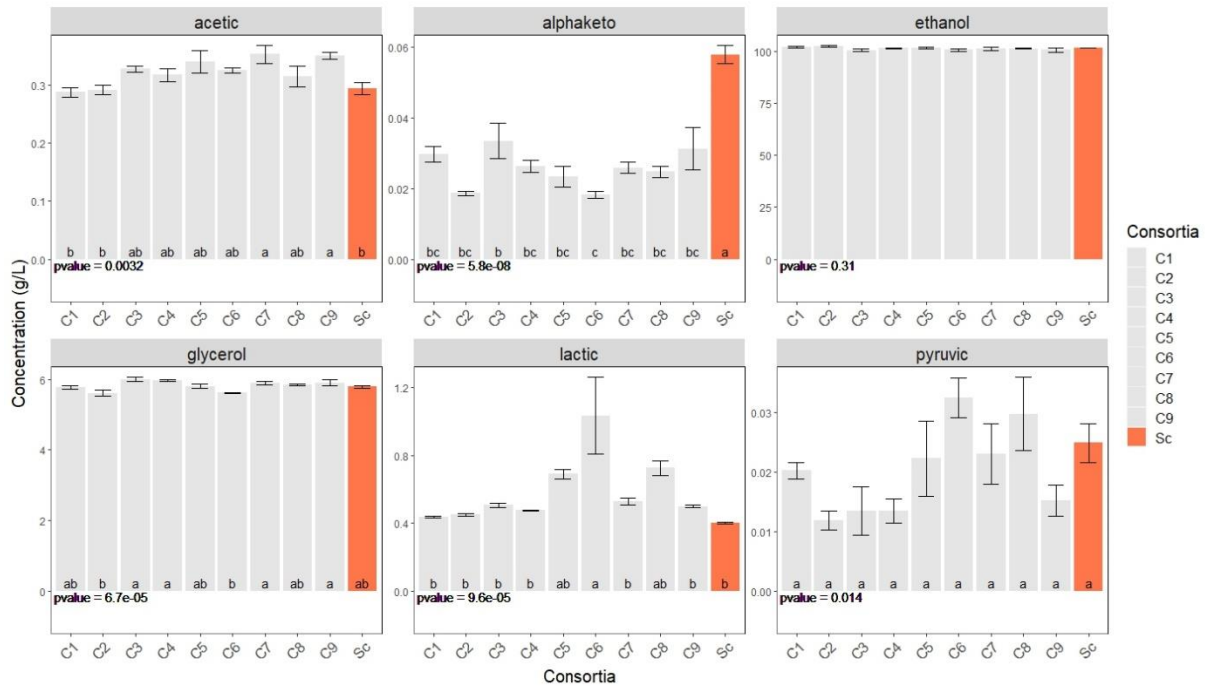


Figure 5: Concentration in g/L of different metabolites at the end of fermentation. Consortia C1 to C9, as well as *S. cerevisiae* monocultures were compared by ANOVA. The letters indicate the statistical group of each consortium as given by the post-hoc Tukey test. Error bars indicate the standard error.

Glycerol and lactic acid displayed differences between consortia (both p-value < 0.001) that were related to specific strains. Indeed, the *M. pulcherrima* MpV4-22 strain, present in consortia C1, C2 and C6, tended to be associated with lower concentrations of glycerol, even though this strain had the same yield as the Mp3324 strain (Figure 3). The most striking strain effect in consortia was related to the *L. thermotolerans* LtS6-47 strain which correlated with overproduction of lactic acid. Indeed, consortia C5, C6 and C8 had final lactic acid concentrations of 0.69 ± 0.054 , 1.03 ± 0.45 and 0.725 ± 0.09 g/L, respectively. The C6 consortium concentration was about twice as high as the lactic concentration observed in consortia that did not include this particular strain, which averaged 0.48 ± 0.04 g/L (Figure 4). Thus, signature of the *L. thermotolerans* LtS6-47 strain could be found in consortia since it was the strain with the highest lactic acid yield in monocultures. On the contrary, despite their presence in the consortia (C1 to C4; C7 and C9), Lt3053 and LtV7-21 did not cause significant difference in lactic acid concentration as compared to *S. cerevisiae* monoculture.

Overall, changing strain composition within the consortium had a notable influence on metabolite production throughout the fermentation process. However, it is important to note

that only a limited number of distinct phenotypic variations could be reliably linked to the presence of specific strain.

Influence of strain composition on population dynamics in consortia. Variations in strain composition did not significantly impact the maximum population which reached approximately 7.9 log (Figure 6). Even though the C6 consortium exhibited a slightly lower maximum population of around 7.75 log, this difference was not significant from other consortia and remained close to the population amplitudes observed in *S. cerevisiae* monocultures. To further examine and compare population dynamics among the different consortia, we also evaluated the time it took for *S. cerevisiae* to reach 50% of the living population. This was possible since *S. cerevisiae* was engineered to express a fluorescent protein (mCherry) to distinguish it from non-*Saccharomyces* cells. In most consortia, *S. cerevisiae* dominated the population after only 39 ± 3 hours. However, in C1 and C2 consortia, *S. cerevisiae* was slower and reached 50% after 52 ± 7 and 61 ± 6 hours respectively without clear explanation. Notably, consortium C1 was also related to the quickest onset of mortality. In this case, around 50% of the cells were dead at about 110 ± 6 hours, while other consortia required between 140 ± 9 (C7) and 172 ± 8 (C2) hours to reach 50% of mortality. These results should be interpreted with caution regarding the actual role of strain composition on population dynamics since other parameters were not affected as much. Hence, new trials should be performed to confirm whether the variations of C1 and C2 were caused by the strain composition.

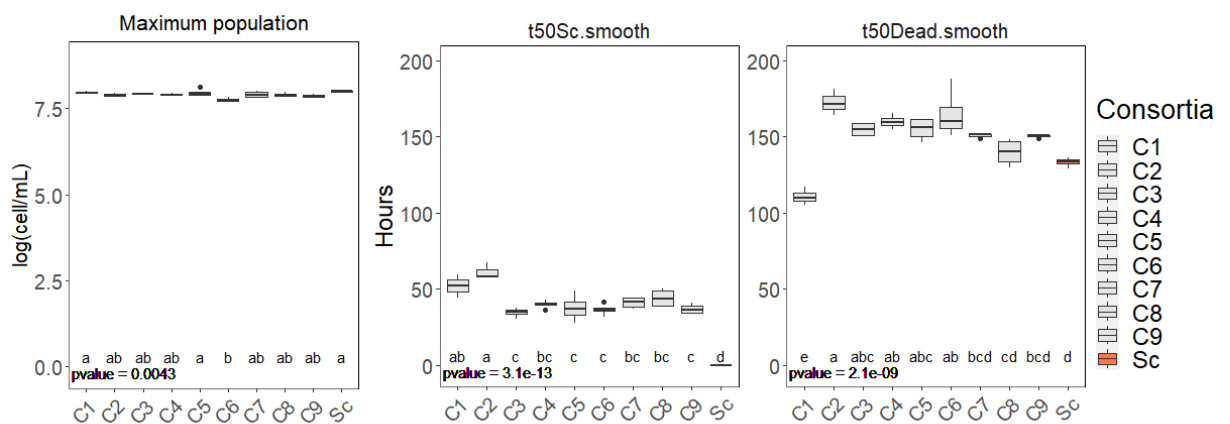


Figure 6: Population dynamics parameters in the different consortia. t50Sc: time needed for *S. cerevisiae* to reach 50% of the live cells (in h). t50Dead: time needed to reach a mortality of 50% of the total cells (*S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces*) in consortia.

Discussion

In this study, we investigated the impact of individual strains on the enological fermentation process within consortia of seven wine yeast species. Prior to evaluating how strain influenced fermentation within consortia, we first focused on examining the inherent variability existing between different strains of each species. Overall, we found that variations were mainly driven by species, but we also found intra-specific variations. Notably, oxidative or low fermentative species such as *M. pulcherrima*, *H. uvarum*, *P. kudriavzevii*, *S. bacillaris* could be discriminated from species with higher fermentative ability such as *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans*. This has already been well characterized by other authors (Barata *et al.* 2012; Jolly *et al.* 2014). Glycerol yields of monocultures of *H. uvarum*, *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans* or *P. kudriavzevii* tended to be higher than those found in literature (Rossouw *et al.* 2016; Binati *et al.* 2019), but retained a consistent species hierarchy.

In addition, our data confirm species-specific traits well documented in the literature. For example, we observed much higher yields of glycerol and pyruvic acid by *S. bacillaris* strains compared to *S. cerevisiae*, as described by Englezos *et al.* (2018). Likewise, *H. uvarum* strains were associated with a high acetic acid yield, which is consistent with previous studies (Ciani *et al.* 1998; Mendoza *et al.* 2019). Except for ethanol, metabolite production varied across strains of the same species (Figure 2). Such strain variability has already been demonstrated in *S. cerevisiae* (Camarasa *et al.*, 2011), and for lactic acid production by *L. thermotolerans* (Hranilovic *et al.* 2018; Morata *et al.* 2018), acetic acid production by *S. bacillaris* (Binati *et al.*, 2019) or glycerol yields of *H. uvarum* for instance (Rossouw and Bauer, 2016).

At the consortia level, our results suggested that modifying the strain composition led to only small changes in the fermentation process but impacted the final concentrations of some metabolites. However, most of the time, the consortia results were only weakly linked to the presence of a specific strain and did not correlate to the monocultures results. High lactic acid concentrations were observed in consortia with the highest lactic acid yield strain of *L. thermotolerans* S6-47, while lower maximum CO₂ rate and glycerol were observed in consortia with *M. pulcherrima* V4-22.

Except for these two strains, individual behavior of monocultures were not reflected in the consortia. There are several possible explanations for this result. First, the differences in

metabolite yields at the consortium level might be related to strain-specific interactions. Indeed, interactions are already known to trigger species-dependent modifications in phenotype and population dynamic in consortia (Ivey *et al.* 2013; Morin *et al.* 2018; Rossouw *et al.* 2018; Harlé *et al.* 2020; Conacher *et al.* 2022). In addition, there is currently a growing body of evidence that strains could also affect consortia population dynamics (Niccum *et al.* 2020; Onetto *et al.* 2021). On the contrary, despite variations in metabolite concentrations, few differences were observed in population dynamics. Maximum population was close in the nine consortia, and invasion of *S. cerevisiae* and mortality kinetics were consistent between seven out of nine consortia. Thus, changes in population dynamics in consortia for different non-*Saccharomyces* strain composition of consortia might be rather limited except in some specific combinations. This would be in line with our previous results on population dynamics in yeast cocultures that were mainly driven at the species level (Pourcelot *et al.*, 2023). However, our data do not include growth of the different species, which may also display strain-specific dynamics in the first hours (Wang *et al.*, 2016). Therefore, these results need to be interpreted with caution. Moreover, testing more strain combinations, as well as other species composition, would help confirm how generic the species level prevailing over the strain level in wine yeast consortia is.

Another explanation for the lack of relation between monocultures and consortia in our work may be the rapid dominance of *S. cerevisiae* over the other yeast species. As indicated by the comparison of phenotypes of the nine consortia to monocultures, the nine consortia have low variability compared to monocultures and they cluster close to *S. cerevisiae*. Thus, consortia might be driven by the presence of *S. cerevisiae* that outgrew other species and reached more than 50% in less than 60 hours in all consortia, despite its low initial inoculation ratio. Even though our study does not include data for each species, previous studies found similar population dynamics of eight species in a consortium, regardless of the presence or absence of indigenous microbial communities (Bagheri *et al.* 2017, 2020). The authors suggested a prevailing effect of *S. cerevisiae* and a limited strain effect in enological fermentation with complex communities. As a result, the short period where *S. cerevisiae* is in low abundance might prevent non-*Saccharomyces* strains to differentiate strongly wine properties (Di Maio *et al.* 2016). The specificity of the winemaking process with a batch fermentation dominated by one species, in comparison to other fermentation processes with

more stable communities, may also make our conclusion specific to the wine fermentation model.

Our results on the effect of strain composition on fermentation of consortia highlighted the complex nature of strain interactions within the consortium, where changes in strain composition can lead to discernible changes in the metabolic outcomes of fermentation. Although these changes cannot be uniformly attributed to each strain, the cumulative impact of strain diversity demonstrates its significant role in shaping the overall behavior of the fermentation process. Thus, additional research is needed to better understand interactions of wine yeasts in complex communities and their consequence on other parameters such as aroma profile.

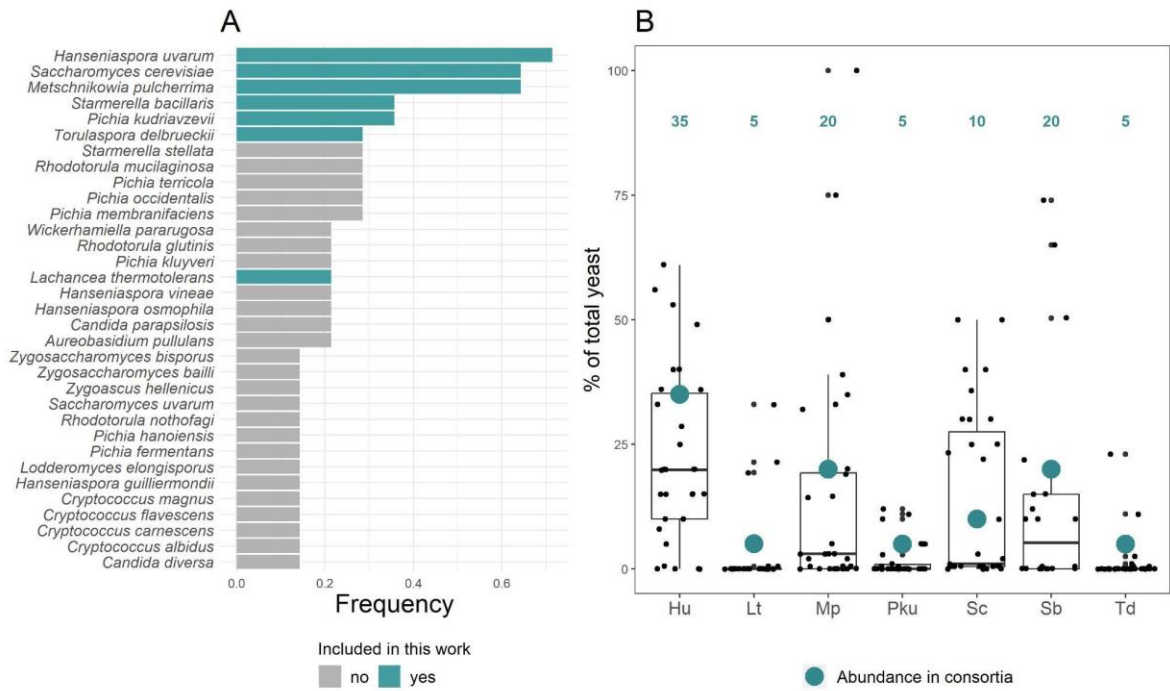
Acknowledgments

We are thankful to F Macna for carrying out the HPLC analyses. We are thankful to the CIRM Levures and C Neuvéglise for providing the yeast strains.

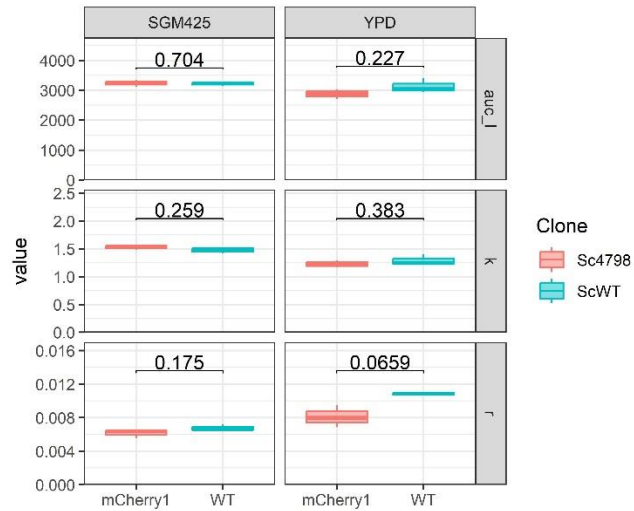
Fundings

GAIA French doctoral school – Montpellier University

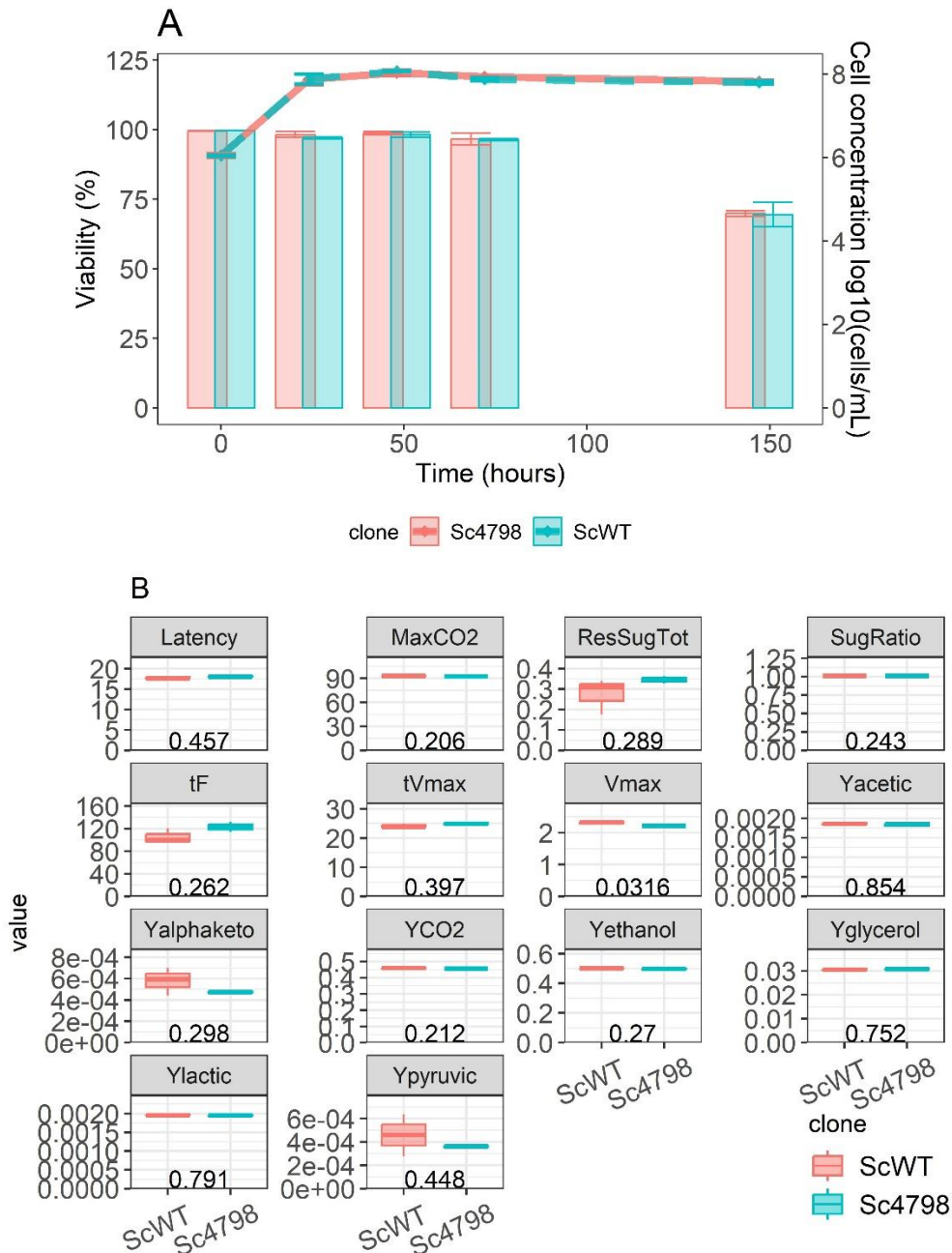
Supplementary Data



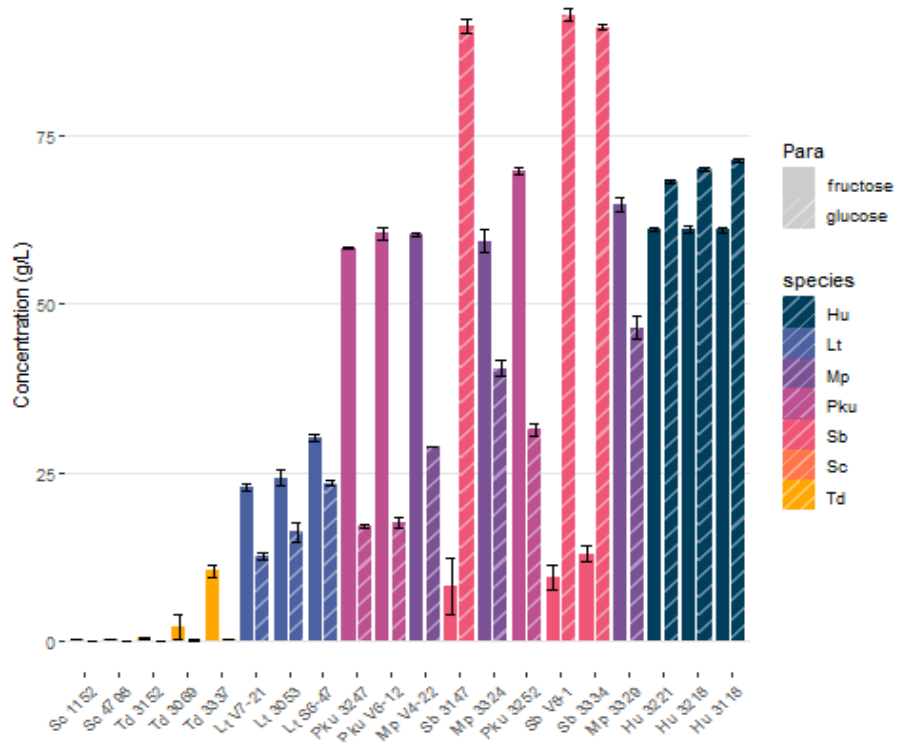
Supplementary Figure 1: Frequency of isolation of the most common yeast species in must or grape in 18 survey papers worldwide. **B:** Proportion of yeast species included in this study, from 11 survey papers. The boxplot and black dots refer to the relative abundance of the different species in natural must. In blue are indicated the relative abundance used in this study. Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Pku: *Pichia kudriavzevii*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Td: *Torulaspota delbrueckii*.



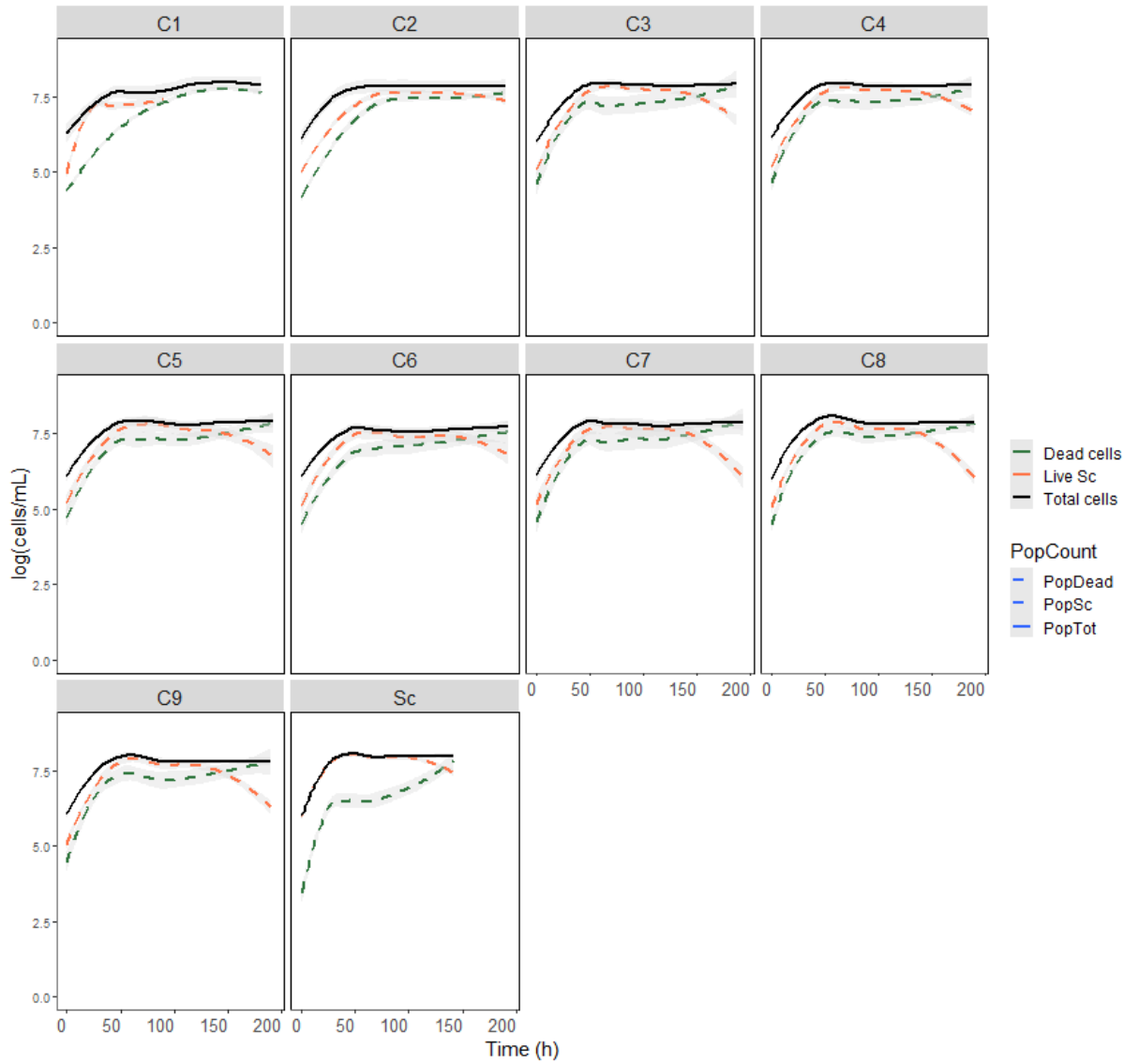
Supplementary Figure 2: Comparison of the growth parameters of the *S. cerevisiae* WT (ScWT) strain and the mCherry-tagged strain (Sc4798) in SGM425 and YPD, during microplate growth assay. *auc_l*: area under the curve, *k*: maximum OD600nm, *r*: growth rate. Figures on the plot indicate the p-value of the T-test comparing both strains.



Supplementary Figure 3: Comparison of fermentation parameters of the *S. cerevisiae* WT (ScWT) strain and the mCherry-tagged strain (Sc4798). **A:** Cell growth (lines) and viability (bars) of both strains during fermentation in SGM425 at 24°C. **B:** Metabolic yields and CO₂ kinetics parameters for both strains. Y stands for yield, SugRatio corresponds to the ratio between consumed glucose and consumed fructose, tF = time needed to stop fermentation (CO₂ rate < 0.02 g/L/h), Latency = time needed to reach 5 g/L of CO₂, Vmax = maximum release rate of CO₂.



Supplementary Figure 4: Residual fructose and glucose when fermentation for the different strains. Strains are ordered with increasing total residual sugar. Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Pku: *Pichia kudriavzevii*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Td: *Torulaspora delbrueckii*.



Supplementary Figure 5: Microbial dynamics in the different consortia expressed in $\log(\text{cells/mL})$. Black solid line: total population; dashed orange line: live cells of *S. cerevisiae*; green dashed line: total dead cells.

Chapitre 2 : Importance de la souche lors de fermentations en consortia

Supplementary Table 1: Residual sugars and metabolite concentrations (g/L) at the end of fermentation in monocultures of the 19 studied strains.

Hu: Hanseniaspora uvarum, *Lt:* Lachancea thermotolerans, *Mp:* Metschnikowia pulcherrima, *Pku:* Pichia kudriavzevii, *Sb:* Starmerella bacillaris, *Sc:* Saccharomyces cerevisiae, *Td:* Torulaspora delbrueckii.

Strain	Residual sugar	Fructose	Glucose	Acetic acid	α -ketoglutaric acid	Ethanol	Glycerol	Lactic acid	Pyruvic acid	Succinic acid	Malic acid
Hu3118	130 ± 0.99	61 ± 0.65	71 ± 0.35	0.66 ± 0.023	0.02 ± 0.02	36 ± 0.67	3.9 ± 0.1	0.075 ± 0.049	0.15 ± 0.05	0.51 ± 0.048	5.9 ± 0.046
Hu3218	130 ± 1.3	61 ± 0.77	70 ± 0.57	0.51 ± 0.03	0.0077 ± 0.009	37 ± 0.67	3.8 ± 0.053	0.067 ± 0.0016	0.13 ± 0.015	0.49 ± 0.023	6 ± 0.035
Hu3221	130 ± 0.81	61 ± 0.41	68 ± 0.47	0.49 ± 0.024	0.0098 ± 0.0042	38 ± 0.096	4 ± 0.029	0.064 ± 0.002	0.19 ± 0.022	0.5 ± 0.0099	5.7 ± 0.11
Lt3053	40 ± 4.5	24 ± 2.2	16 ± 2.4	0.32 ± 0.018	0.018 ± 0.0076	75 ± 2.6	6.3 ± 0.05	5.8 ± 0.11	0.041 ± 0.0061	0.57 ± 0.016	5.7 ± 0.072
LtS6-47	54 ± 1.4	30 ± 0.86	23 ± 0.5	0.21 ± 0.0044	0.018 ± 0.018	69 ± 0.93	4.6 ± 0.064	9.1 ± 0.26	0.092 ± 0.052	0.46 ± 0.032	5.3 ± 0.13
LtV7-21	35 ± 1.6	23 ± 0.75	12 ± 0.89	0.41 ± 0.0027	0.045 ± 0.014	78 ± 0.92	6.3 ± 0.054	3.7 ± 0.057	0.028 ± 0.0092	0.49 ± 0.011	5.9 ± 0.05
Mp3324	100 ± 5.1	59 ± 3.1	40 ± 2	0.19 ± 0.04	0.14 ± 0.0072	41 ± 0.16	4.1 ± 0.098	0.02 ± 0.0048	0.031 ± 0.0013	1.2 ± 0.043	6.4 ± 0.049
Mp3329	110 ± 4.4	65 ± 1.8	47 ± 2.8	0.12 ± 0.038	0.21 ± 0.018	37 ± 2.5	5.4 ± 0.18	0.035 ± 0.014	0.061 ± 0.0092	1.2 ± 0.14	6.8 ± 0.038
MpV4-22	89 ± 0.33	60 ± 0.31	29 ± 0.061	0.25 ± 0.025	0.17 ± 0.043	46 ± 0.088	4.5 ± 0.017	0.071 ± 0.031	0.074 ± 0.039	2.6 ± 0.093	6 ± 0.083
Pku3247	75 ± 0.81	58 ± 0.31	17 ± 0.51	0.46 ± 0.018	0.053 ± 0.0024	60 ± 0.64	6.4 ± 0.097	0.07 ± 0.0033	0.082 ± 0.0037	0.4 ± 0.011	7 ± 0.12
Pku3252	100 ± 2.4	70 ± 0.94	31 ± 1.5	0.3 ± 0.015	0.062 ± 0.013	46 ± 1.1	6.1 ± 0.2	0.054 ± 0.0024	0.11 ± 0.068	0.33 ± 0.015	7.2 ± 0.15
PkuV6-12	78 ± 2.9	60 ± 1.4	18 ± 1.5	0.46 ± 0.016	0.057 ± 0.01	58 ± 1.7	6.4 ± 0.011	0.077 ± 0.025	0.077 ± 0.0072	0.44 ± 0.009	6.8 ± 0.051
Sb3147	99 ± 8.8	8.2 ± 7.3	91 ± 1.6	0.15 ± 0.096	0.23 ± 0.062	47 ± 7	7.5 ± 0.89	0.077 ± 0.049	0.75 ± 0.15	0.42 ± 0.13	7.2 ± 0.25
Sb3334	100 ± 2.7	13 ± 2	91 ± 0.7	0.075 ± 0.073	0.15 ± 0.0014	44 ± 0.97	7.3 ± 0.14	0.074 ± 0.031	0.81 ± 0.044	0.36 ± 0.0049	7.7 ± 0.1
SbV8-1	100 ± 1.8	9.4 ± 3.3	93 ± 1.5	0.1 ± 0.059	0.21 ± 0.08	44 ± 1.3	7.8 ± 0.26	0.062 ± 0.02	0.86 ± 0.12	0.35 ± 0.024	7.7 ± 0.093
Sc4798	0.35 ± 0.026	0.33 ± 0.018	0.017 ± 0.0077	0.37 ± 0.017	0.096 ± 0.0031	100 ± 0.31	6.2 ± 0.12	0.4 ± 0.0041	0.073 ± 0.0046	0.75 ± 0.027	6.2 ± 0.0021
Td3069	2.3 ± 3.3	2.2 ± 3.1	0.1 ± 0.12	0.28 ± 0.016	0.021 ± 0.0063	99 ± 1.5	5.5 ± 0.088	0.21 ± 0.0068	0.039 ± 0.012	0.74 ± 0.013	5.8 ± 0.17
Td3152	0.43 ± 0.17	0.41 ± 0.17	0.022 ± 0.0059	0.32 ± 0.012	0.046 ± 0.021	100 ± 1	5.6 ± 0.16	0.68 ± 0.048	0.18 ± 0.044	0.78 ± 0.02	7.4 ± 0.44
Td3337	11 ± 1.6	10 ± 1.5	0.28 ± 0.15	0.19 ± 0.015	0.04 ± 0.0016	94 ± 1.4	6.8 ± 0.041	0.69 ± 0.094	0.16 ± 0.0043	0.81 ± 0.046	7.1 ± 0.47

Chapitre 2 : Importance de la souche lors de fermentations en consortia

Supplementary Table 2: Average concentrations (in g/L) of metabolites and residual sugars at the end of fermentation in consortia and *S. cerevisiae* (*Sc*) monoculture, and yield in ethanol, glycerol, acetic acid and lactic acid (with Y prefix, in g of metabolite/g of consumed sugar).

	Consummed sugar	Acetic acid	α -Ketoglutaric acid	Ethanol	Glycerol	Lactic acid	Pyruvic acid	popMax
C1	201 ± 0.097 ab	0.287 ± 0.015 c	0.0296 ± 0.0037 ab	102 ± 0.77 a	5.76 ± 0.088 ab	0.435 ± 0.009 b	0.0203 ± 0.0024 a	92500000 ± 5600000 a
C2	201 ± 0.034 ab	0.291 ± 0.014 bc	0.0186 ± 0.001 ab	103 ± 0.57 a	5.61 ± 0.15 b	0.451 ± 0.014 b	0.0119 ± 0.0027 a	78500000 ± 7e+06 ab
C3	201 ± 0.58 a	0.327 ± 0.011 abc	0.0334 ± 0.01 a	100 ± 1.2 a	6 ± 0.12 a	0.506 ± 0.025 b	0.0135 ± 0.0081 a	82800000 ± 1900000 ab
C4	200 ± 1.1 ab	0.316 ± 0.021 abc	0.0262 ± 0.0036 ab	102 ± 0.48 a	5.97 ± 0.046 a	0.475 ± 0.0059 b	0.0135 ± 0.004 a	81100000 ± 7300000 ab
C5	200 ± 1.3 ab	0.34 ± 0.037 abc	0.0233 ± 0.0057 ab	102 ± 0.63 a	5.8 ± 0.13 ab	0.69 ± 0.054 ab	0.0223 ± 0.013 a	93500000 ± 2.9e+07 a
C6	201 ± 0.43 a	0.325 ± 0.0092 abc	0.0182 ± 0.0019 b	101 ± 1.3 a	5.62 ± 0.031 b	1.03 ± 0.45 a	0.0325 ± 0.0066 a	56500000 ± 8900000 b
C7	201 ± 0.28 ab	0.352 ± 0.031 a	0.0258 ± 0.0031 ab	101 ± 1.3 a	5.9 ± 0.092 a	0.529 ± 0.041 b	0.0231 ± 0.01 a	81600000 ± 1.7e+07 ab
C8	199 ± 0.78 b	0.314 ± 0.036 abc	0.0247 ± 0.0033 ab	101 ± 0.56 a	5.84 ± 0.055 ab	0.725 ± 0.09 ab	0.0298 ± 0.012 a	81100000 ± 9200000 ab
C9	200 ± 0.34 ab	0.35 ± 0.011 ab	0.0312 ± 0.012 ab	101 ± 2.1 a	5.9 ± 0.16 a	0.5 ± 0.013 b	0.0152 ± 0.0052 a	74700000 ± 5800000 ab
Sc	200 ± 1.1	0.293 ± 0.021	0.0578 ± 0.0052	102 ± 0.3	5.79 ± 0.066	0.401 ± 0.0073	0.0249 ± 0.0066	1e+08 ± 2600000

	Yethanol	Yglycerol	Yacetic	Ylactic
C1	0.507 ± 0.0041	0.0287 ± 0.00045 ab	0.00143 ± 7.2e-05 b	0.00217 ± 4.6e-05 b
C2	0.511 ± 0.0029	0.0279 ± 0.00077 b	0.00145 ± 6.7e-05 b	0.00225 ± 7e-05 b
C3	0.499 ± 0.0069	0.0298 ± 0.00052 a	0.00163 ± 5.4e-05 ab	0.00252 ± 0.00012 b
C4	0.508 ± 0.0039	0.0299 ± 0.00023 a	0.00158 ± 9.8e-05 ab	0.00238 ± 4.1e-05 b
C5	0.508 ± 0.0044	0.029 ± 0.00061 ab	0.0017 ± 0.00018 ab	0.00345 ± 0.00029 ab
C6	0.5 ± 0.0073	0.0279 ± 2e-04 b	0.00161 ± 4.7e-05 ab	0.00513 ± 0.0022 a
C7	0.504 ± 0.006	0.0294 ± 0.00044 a	0.00175 ± 0.00015 a	0.00263 ± 0.00021 b
C8	0.508 ± 0.0019	0.0293 ± 0.00036 a	0.00158 ± 0.00017 ab	0.00364 ± 0.00046 ab
C9	0.502 ± 0.011	0.0295 ± 0.00073 a	0.00175 ± 5.7e-05 a	0.0025 ± 6.3e-05 b
Sc	0.509 ± 0.0019	0.029 ± 0.00017	0.00147 ± 9.7e-05	0.00201 ± 2.9e-05

References

- Baffi, M.A., dos Santos Bezerra, C., Arévalo-Villena, M., Isabel Briones-Pérez, A., Gomes, E., Da Silva, R., 2011. Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. *Ann. Microbiol.* 61, 75–78. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0099-z>
- Bagheri, B., Bauer, F.F., Cardinali, G., Setati, M.E., 2020. Ecological interactions are a primary driver of population dynamics in wine yeast microbiota during fermentation. *Sci. Rep.* 10, 4911. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61690-z>
- Bagheri, B., Bauer, F.F., Setati, M.E., 2017. The Impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a Wine Yeast Consortium in Natural and Inoculated Fermentations. *Front. Microbiol.* 8, 1988. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01988>
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 243–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., Barre, P., 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 70, 246–252. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90057-4)
- 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 Res. Int. Ott. Ont* 122, 432–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.043>
- Blasche, S., Kim, Y., Oliveira, A.P., Patil, K.R., 2017. Model microbial communities for ecosystems biology. *Curr. Opin. Syst. Biol.* 6, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.09.002>
- 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, e25147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025147>
- Ciani, M., Maccarelli, F., 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making 14.
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017>
- Conacher, C.G., Naidoo-Blassoples, R.K., Rossouw, D., Bauer, F.F., 2022. A Transcriptomic Analysis of Higher-Order Ecological Interactions in a Eukaryotic Model Microbial Ecosystem. *mSphere* 7, e00436-22. <https://doi.org/10.1128/msphere.00436-22>
- Conacher, C.G., Naidoo-Blassoples, R.K., Rossouw, D., Bauer, F.F., 2021. Exploring multispecies interactions between wine-associated yeasts. Stellenbosch; South Africa.
- Di Maio, S., Genna, G., Gandolfo, V., Amore, G., Ciaccio, M., Oliva, D., 2016. Presence of *Candida zemplinina* in Sicilian Musts and Selection of a Strain for Wine Mixed Fermentations. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 33. <https://doi.org/10.21548/33-1-1309>
- Di Maro, E., Ercolini, D., Coppola, S., 2007. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.007>
- Díaz, C., Molina, A.M., Nähring, J., Fischer, R., 2013. Characterization and dynamic behavior of wild yeast during spontaneous wine fermentation in steel tanks and amphorae. *BioMed Res. Int.* 2013, 540465. <https://doi.org/10.1155/2013/540465>
- Drumonde-Neves, J., Fernandes, T., Lima, T., Pais, C., Franco-Duarte, R., 2021. Learning from 80 years of studies: a comprehensive catalogue of non-*Saccharomyces* yeasts associated with viticulture and winemaking. *FEMS Yeast Res.* 21, foab017. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab017>
- Fleet, G.H., 2007. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.010>

- Ghosh, S., Bagheri, B., Morgan, H.H., Divol, B., Setati, M.E., 2015. Assessment of wine microbial diversity using ARISA and cultivation-based methods. *Ann. Microbiol.* 65, 1833–1840. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-1021-x>
- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., Hegemann, J.H., 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24, 2519–2524. <https://doi.org/10.1093/nar/24.13.2519>
- 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, e0233285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233285>
- Harrouard, J., Eberlein, C., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., Masneuf-Pomarede, I., Miot-Sertier, C., Schacherer, J., Albertin, W., Ropars, J., 2022. *Brettanomyces bruxellensis*: Overview of the genetic and phenotypic diversity of an anthropized yeast. *Mol. Ecol. mecl*.16439. <https://doi.org/10.1111/mec.16439>
- Helton, J.C., Davis, F.J., 2003. Latin hypercube sampling and the propagation of uncertainty in analyses of complex systems. *Reliab. Eng. Syst. Saf.* 81, 23–69. [https://doi.org/10.1016/S0951-8320\(03\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0951-8320(03)00058-9)
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Guillamón, J.M., 2007. Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. *FEMS Yeast Res.* 7, 1340–9. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00304.x>
- Hranilovic, A., Gambetta, J.M., Schmidtke, L., Boss, P.K., Grbin, P.R., Masneuf-Pomarede, I., Bely, M., Albertin, W., Jiranek, V., 2018. Oenological traits of *Lachancea thermotolerans* show signs of domestication and allopatric differentiation. *Sci. Rep.* 8, 14812. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33105-7>
- Ivey, M., Massel, M., Phister, T.G., 2013. Microbial interactions in food fermentations. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 141–62. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101219>
- Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S., 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 14, 215–37. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., Christensen, R.H.B., 2017. **ImerTest** Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *J. Stat. Softw.* 82. <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
- Lee, S., Lim, W.A., Thorn, K.S., 2013. Improved blue, green, and red fluorescent protein tagging vectors for *S. cerevisiae*. *PLOS ONE* 8, 67902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067902>
- Mandakovic, D., Pulgar, R., Maldonado, J., Mardones, W., González, M., Cubillos, F.A., Cambiazo, V., 2020. Fungal Diversity Analysis of Grape Musts from Central Valley-Chile and Characterization of Potential New Starter Cultures. *Microorganisms* 8, 956. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060956>
- Mateus, D., Sousa, S., Coimbra, C., Rogerson, F., Simões, J., 2020. Identification and Characterization of Non-*Saccharomyces* Species Isolated from Port Wine Spontaneous Fermentations. *Foods Basel Switz.* 9. <https://doi.org/10.3390/foods9020120>
- Maturano, Y.P., Mestre, M.V., Esteve-Zarzoso, B., Nally, M.C., Lerena, M.C., Toro, M.E., Vazquez, F., Combina, M., 2015. Yeast population dynamics during prefermentative cold soak of Cabernet Sauvignon and Malbec wines. *Int. J. Food Microbiol.* 199, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.005>
- Mendiburu, F., 2010. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R Package Version 1, 1–8.
- Mendoza, L.M., Vega-Lopez, G.A., Fernández de Ullivarri, M., Raya, R.R., 2019. Population and oenological characteristics of non-*Saccharomyces* yeasts associated with grapes of Northwestern Argentina. *Arch. Microbiol.* 201, 235–244. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1601-4>

- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M., González, C., Suárez Lepe, J., 2018. *Lachancea thermotolerans* Applications in Wine Technology. Fermentation 4, 53. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030053>
- Morgan, S.C., McCarthy, G.C., Watters, B.S., Tantikachornkiat, M., Zigg, I., Cliff, M.A., Durall, D.M., 2019. Effect of sulfite addition and pied de cuve inoculation on the microbial communities and sensory profiles of Chardonnay wines: dominance of indigenous *Saccharomyces uvarum* at a commercial winery. FEMS Yeast Res. 19. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz049>
- Morin, M., Pierce, E.C., Dutton, R.J., 2018. Changes in the genetic requirements for microbial interactions with increasing community complexity. eLife 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.37072>
- Niccum, B.A., Kastman, E.K., Kfoury, N., Robbat, A., Wolfe, B.E., 2020. Strain-Level Diversity Impacts Cheese Rind Microbiome Assembly and Function. mSystems 5, e00149-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00149-20>
- Ocón, E., Gutiérrez, A.R., Garijo, P., Tenorio, C., López, I., López, R., Santamaría, P., 2010. Quantitative and qualitative analysis of non-*Saccharomyces* yeasts in spontaneous alcoholic fermentations. Eur. Food Res. Technol. 230, 885–891. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1233-7>
- Onetto, C.A., Borneman, A.R., Schmidt, S.A., 2021. Strain-Specific Responses by *Saccharomyces cerevisiae* to Competition by Non-*Saccharomyces* Yeasts. Fermentation 7, 165. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030165>
- Piccardi, P., Vessman, B., Mitri, S., 2019. Toxicity drives facilitation between 4 bacterial species. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116, 15979–15984. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906172116>
- Pourcelot, E., Conacher, C., Marlin, T., Bauer, F., Galeote, V., Nidelet, T., 2023. Comparing the hierarchy of inter-and intraspecies interactions with population dynamics of wine yeast cocultures. FEMS Yeast Res. foa039.
- R Core Team, 2022. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rossouw, D., Bauer, F.F., 2016. Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity. Food Microbiol. 55, 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.017>
- Rossouw, D., Meiring, S.P., Bauer, F.F., 2018. Modifying *Saccharomyces cerevisiae* Adhesion Properties Regulates Yeast Ecosystem Dynamics. mSphere 3, e00383-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00383-18>
- Roy, K., Marzorati, M., van den Abbeele, P., van de Wiele, T., Boon, N., 2014. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. Environ. Microbiol. 16, 1472–81. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12343>
- Schmidt, S.A., Kolouchova, R., Forgan, A.H., Borneman, A.R., 2020. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Competitive Fitness in Enologically Relevant Environments by Barcode Sequencing. G3 Bethesda Md 10, 591–603. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400743>
- Shong, J., Jimenez Diaz, M.R., Collins, C.H., 2012. Towards synthetic microbial consortia for bioprocessing. Curr. Opin. Biotechnol. 23, 798–802. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.02.001>
- Silva, M., Pontes, A., Franco-Duarte, R., Soares, P., Sampaio, J.P., Sousa, M.J., Brito, P.H., 2022. A glimpse at an early stage of microbe domestication revealed in the variable genome of *Torulaspora delbrueckii*, an emergent industrial yeast. Mol. Ecol. mec.16428. <https://doi.org/10.1111/mec.16428>
- Silva-Sousa, F., Fernandes, T., Pereira, F., Rodrigues, D., Rito, T., Camarasa, C., Franco-Duarte, R., Sousa, M.J., 2022. *Torulaspora delbrueckii* Phenotypic and Metabolic Profiling towards Its Biotechnological Exploitation. J. Fungi Basel Switz. 8, 596. <https://doi.org/10.3390/jof8060569>
- Sternes, P.R., Lee, D., Kutyna, D.R., Borneman, A.R., 2017. A combined meta-barcoding and shotgun metagenomic analysis of spontaneous wine fermentation. GigaScience 6, 1–10. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix040>

- Wang, C., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., 2016. The Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and Non-*Saccharomyces* Yeast during Alcoholic Fermentation Is Species and Strain Specific. *Front. Microbiol.* 7, 502. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00502>
- Wickham, H., Vaughan, D., Girlich, M., 2023. tidy: Tidy Messy Data.
- Xenophontos, C., Taubert, M., Harpole, W.S., Küsel, K., 2021. Phylogenetic and metabolic diversity have contrasting effects on the ecological functioning of bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 97, fiab017. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab017>
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.001>

Analyse complémentaire

Les résultats de ce chapitre confirment globalement les résultats du premier chapitre et montrent que c'est bien la composition en espèce qui impacte les performances fermentaires plus que celle en souche lors de fermentation en consortia. Ces résultats nous ont aussi permis de choisir les souches que nous utiliserons dans notre consortium modèle. Nous avons pour cela comparé les différents consortia par rapport à la moyenne de l'ensemble des consortia (**Figure 10**).

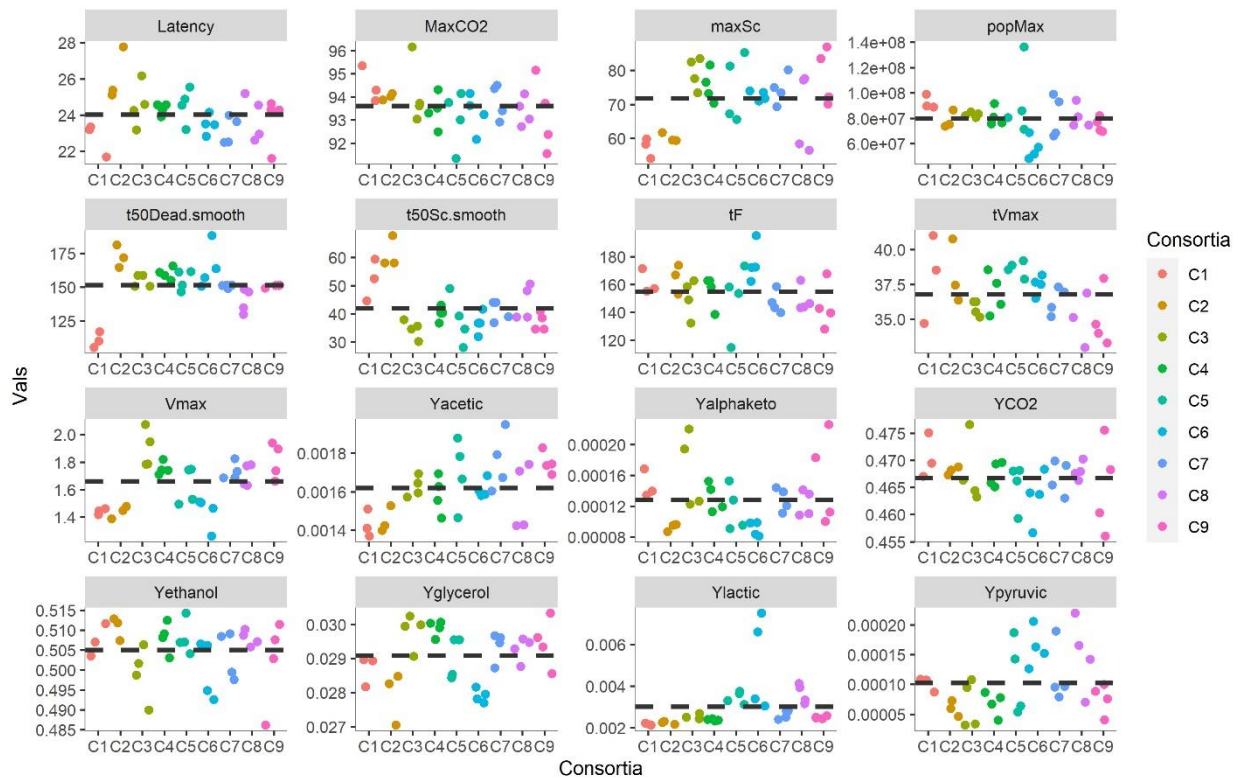


Figure 10 : Comparaison de l'ensemble des paramètres étudiés des différents consortia par rapport à la moyenne entre consortia (indiquée par la ligne pointillée).

Pour comparer numériquement les différents consortia, le vecteur comprenant les valeurs de l'ensemble des paramètres de chaque réplicat a été comparé au vecteur comprenant l'ensemble des valeurs de la moyenne de toutes les fermentations. La comparaison a été réalisée en calculant la distance euclidienne entre les deux vecteurs, sur les valeurs brutes et sur les valeurs normalisées. Les distances moyennes par consortia sont présentées en Tableau 2.

Tableau 2 : Résultats du calcul de la distance euclidienne entre chaque consortium et la moyenne de tous les consortia sur les résultats de l'ensemble des paramètres considérés dans cette étude.

Consortia	Distance brute	Distance après normalisation
C1	1,25E+07	4,26
C2	1,41E+06	4,46
C3	2,86E+06	2,72
C4	1,14E+06	1,71
C5	1,36E+07	1,92
C6	2,34E+07	4,05
C7	1,60E+06	1,53
C8	1,16E+06	1,80
C9	5,22E+06	2,38
Moyenne	0,00E+00	0

Suite à cette analyse, nous avons sélectionné le consortium C4 puisqu'en distance brut, il est le plus proche de la moyenne des consortia (Tableau 2). L'analyse sur la distance après normalisation n'a été réalisée qu'ensuite, mais confirme qu'il s'agit d'un consortium proche de la moyenne. Ce sont donc les souches du consortium C4 qui ont été choisies pour la suite de ce travail.

Chapitre 3 :

**Caractérisation fermentaire d'une
communauté de six espèces de levures
œnologiques**

Le travail de ce chapitre visait à concevoir un consortium de six espèces de levures reflétant la diversité des levures de vin et à développer une méthode permettant de suivre avec précision la dynamique de leur population au cours de la fermentation.

La stratégie de suivi des populations retenue dans ce travail consiste à marquer chaque espèce de levure avec des protéines fluorescentes distinctes. Cela permet un suivi en temps réel des espèces individuelles au sein du consortium en distinguant les espèces par cytométrie en flux. Au départ, cinq protéines fluorescentes ont été considérées : EGFP, mCherry, mCitrine, mTagBFP2 et T-Sapphire. Couplés à l'utilisation d'une souche de *S. cerevisiae* comportant 2 protéines fluorescentes, ces cinq fluorochromes devaient permettre de distinguer les sept espèces étudiées dans le chapitre 2. Toutefois, des tests sur les souches marquées ont montré une mauvaise identification du signal lors de l'utilisation de la protéine fluorescente T-Sapphire. En conséquence, le consortium a été réduit à six espèces : *S. cerevisiae* (mCherry et EGFP), *H. uvarum* (mTagBFP2), *S. bacillaris* (EGFP), *T. delbrueckii* (mCitrine), *L. thermotolerans* (mCherry) et *M. pulcherrima* (non marquée). Nous avons choisi d'éliminer *P. kudriavzevii* de l'étude du fait de son intérêt œnologique moins important, bien que sa fréquence d'isolation, avec d'autres espèces du genre *Pichia*, soit plus importante que *L. thermotolerans* ou *T. delbrueckii*.

D'un point de vue méthodologie, nous avons construit les différentes souches du consortium, grâce à la méthodologie de transformation développée dans le premier chapitre. Nous avons ensuite optimisé et validé notre capacité à mesurer de façon effective la concentration des différentes espèces dans un ensemble de communautés factices.

Ce chapitre détaille également l'analyse complète de ce consortium, en étudiant l'évolution des populations dans le temps et en examinant des facteurs tels que la production de métabolites et la cinétique de fermentation.

Par ailleurs, la caractérisation du consortium C4 sera complétée par l'analyse des cinétiques de consommation des sources d'azote assimilable, pour laquelle des prélèvements ont été réalisés en même temps que pour les métabolites et la dynamique de population. Cela permettra également de compléter les données sur les besoins azotés des non-*Saccharomyces*, qui restent encore peu étudiés. L'appareil nécessaire est en cours d'installation au sein de l'UMR SPO, mais n'a pas été disponible dans les temps.

Design and validation of a model yeast consortium for enological fermentation

Authors: Eléonore Pourcelot¹, Thérèse Marlin¹, Virginie Galeote¹, Thibault Nidelet¹

Affiliations: ¹SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

Abstract

Wine fermentation encompasses complex microbial communities of non-*Saccharomyces* (NS) yeast species in addition to the well-known *Saccharomyces cerevisiae*. While extensive research has enhanced our understanding of *S. cerevisiae*, the development of multi-species fermentation starters has led to increased interest in yeast interactions and the role of microbial diversity in winemaking. Consequently, molecular methods have emerged to identify the different species at different stages of the winemaking process. Model microbial communities or consortia, which provide simplified systems resembling natural microbial diversity, enable us to study population dynamics and understand the role of community diversity in ecosystem performance.

Here, this work aims to design a six-species yeast consortium reflecting the diversity of wine yeasts and to develop a method for accurately tracking their population dynamics during fermentation. Thus, we developed and characterized a six-species consortium, with *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Starmerella bacillaris*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans* and *Torulaspora delbrueckii*. By tagging each yeast species with distinct fluorescent markers, the study enables real-time monitoring of individual species within the consortium using flow cytometry. The study involves optimizing and validating this cytometry-based method, using known proportions of the six species in mock communities to validate its accuracy. Thus, we have carried out a complete analysis of this consortium, studying the evolution of populations over time and examining factors such as metabolite production and fermentation kinetics. This consortium can contribute to future work trying to decipher multispecies dynamics and exploring the role of yeast diversity in wine fermentation.

Introduction

Fermented foods and beverages are consumed worldwide, and their production relies on diversified microbial communities that include numerous bacteria and yeasts (Furukawa *et al.* 2013; Wolfe and Dutton 2015; Tamang *et al.* 2016). Wine alcoholic fermentation involves different yeast species from the *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Starmerella*, *Torulasporea*, *Lachancea*, or *Rhodothorula* genera (Barata *et al.*, 2012; Drumonde-Neves *et al.*, 2021). Research has mainly been focused on optimizing the process with *Saccharomyces cerevisiae*, as it is the main species carrying out the alcoholic fermentation. Thus extensive knowledge has been provided on *S. cerevisiae* growth, and its influence on wine aroma as well as the genetic basis of its suitability for fermentation (Lambrechts *et Pretorius* 2000; Sablayrolles 2009; Peter *et al.* 2018). However, the development of multispecies starters, with one or two non-*Saccharomyces* strains alongside *S. cerevisiae* (Roudil *et al.* 2020), has spurred research on interactions between yeast species and on the role of wine microbial diversity in the process (Ivey *et al.* 2013; Ciani and Comitini 2015; Bordet *et al.* 2020). Consequently, an increasing number of studies now focus on wine microbial communities, namely owing to the development of molecular methods that enable the identification of the different species at different stages of winemaking (Esteve-Zarzoso 1999; Sternes *et al.* 2017; Loira *et al.* 2020).

Model microbial communities, also called consortia, allow working on simplified systems that mimic the diversity found in natural communities (Blasche *et al.*, 2017; Roy *et al.*, 2014). These consortia include species found in natural communities, and are used in controlled environments to foster knowledge on ecological drivers of population dynamics as well as decipher the role of community diversity in its functioning (Wolfe *et al.* 2014; Venturelli *et al.* 2018; Piccardi *et al.* 2019; Niccum *et al.* 2020). Several methods can be used to evaluate the evolution of population in such consortia, such as differential culture media, quantitative PCR or metabarcoding. Cytometry has recently proven useful to monitor population dynamics in multispecies communities (Rigottier-Gois *et al.* 2003; Kylilis *et al.* 2018) and model wine yeast pairwise cocultures and consortia (Longin *et al.* 2017; Conacher *et al.* 2020).

The present study aimed to develop a novel six-species consortium representative of wine yeast diversity as well as the method to discriminate its different species population.

This consortium consisted of one strain of six different species, modified with a specific fluorescent tag, at different initial abundance. Strains and initial abundance were determined in a previous study and chosen as follow: *Saccharomyces cerevisiae* (10% of total population), *Hanseniaspora uvarum* (35%), *Metschnikowia pulcherrima* (25%), *Starmerella bacillaris* (20%), *Lachancea thermotolerans* (5%), and *Torulaspora delbrueckii* (5%). We also characterized, in synthetic grape must, populations dynamics fermentation kinetics, and metabolite production of the consortia and the six strains.

Materials and methods

a. Strains and media

In this study, six wine yeasts species were used: *Hanseniaspora uvarum*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Starmerella bacillaris*, and *Torulaspora delbrueckii*. Details of the strain are available in Table 1. Strains were kept at -80°C in yeast peptone dextrose YPD (1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% glucose) supplemented with 20% of glycerol before being streaked on YPD agar and incubated at 28°C. *Escherichia coli* DH5a bacteria (New England Biolabs), used for plasmid constructions, were grown on LB medium (1% tryptone, 0,5% yeast extract, 0,5% NaCl) supplemented with 100 µg/mL of ampicillin antibiotic (Sigma A9817). For solid media preparation, agar was added to the media at 2 %.

Table 1: List of yeast strains used in this study.

Species	Strain name	Code	Genotype	Provider/Reference
<i>S. cerevisiae</i>	MTF4798		<i>TDH3-mCherry-kanMX</i>	Pourcelot, et al (in preparation)
<i>S. cerevisiae</i>	MTF5119	Sc	<i>TDH3-mCherry-kanMX ENO2-GFP-natMX4</i>	This study
<i>H. uvarum</i>	CLIB3118			CIRM
<i>H. uvarum</i>	MTF5118	Hu	<i>TDH3-BFP2-kanMX</i>	This study
<i>L. thermotolerans</i>	PYV7-21			SPO lab
<i>L. thermotolerans</i>	MTF4901	Lt	<i>TDH3-mCherry-natMX4</i>	This study
<i>M. pulcherrima</i>	CLIB3329	Mp		CIRM
<i>T. delbrueckii</i>	CLIB3152			CIRM
<i>T. delbrueckii</i>	MTF5120	Td	<i>TDH3-mCitrine-natMX4</i>	This study
<i>S. bacillaris</i>	CLIB3147			CIRM
<i>S. bacillaris</i>	MTF4909	Sb	<i>TDH3-eGFP-hphMX6</i>	This study

b. *Fluorescent strains construction*

Plasmid construction. The following plasmids were constructed by Gibson assembly (Gibson et al., 2009): pFA6a-link-yEmCitrine-NATMX, pFA6a-link-yomCherry-NATMX, pFA6-TDH3.1kb.Td-mCitrine-NATMX, pFA6-Hu1kb-BFP2-KAN. Gibson assembly were done using the NEB Builder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs) and transformed into *Escherichia coli* DH5a (New England Biolabs) following the manufacturer instructions. pFA6 plasmid backbone, antibiotic resistance genes (KANMX, HPHMX), and fluorescent protein genes (EGFP, mCherry, mCitrine, mTagBFP2) were obtained from plasmids ordered from AddGene (#44900, #44899, #44645, #44903, Supplementary Table 1) (Sheff et Thorn 2004 ; Lee *et al.* 2013). Primers used for the amplification of fragments used for the assembly are listed in Supplementary Table 2. Where necessary, homologous sequences of approximately 1kb were amplified from the target species (*T. delbruecki* CLIB3069, *H. uvarum* CLIB3221, *S. bacillaris* CLIB3147). All plasmids were checked by enzymatic digestion (New England Biolabs). Plasmid DNA was extracted from 3 mL of overnight *E. coli* LB (with 100 µg/mL of ampicillin) culture with the NucleoSpin Plasmid extraction kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) according to manufacturer instructions.

Yeast genetic modification. Genes coding for fluorescent proteins were integrated into the genome in fusion of *TDH3* gene (or its orthologue in non-*Saccharomyces*). Cassettes used for transformation were amplified from plasmid matrices listed in Supplementary Table 1 with a high fidelity enzyme, either the KAPA HiFi kit (Cape Town, South Africa) or Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania), using primers specific to each species, as listed in

Supplementary Table 3. PCR amplification products were purified with the PCR clean-up Kit (Machery Nagel, Düren, Germany, REF 740609). In addition, *S. cerevisiae* was tagged with a second fluorescent protein, in fusion of *ENO2*, another gene involved in glycolysis. *TDH3* has a strong promoter and is expressed continuously during fermentation in *S. cerevisiae*. Similarly, *ENO2* is also expressed throughout *S. cerevisiae* fermentation, even though to a lesser extent (Puig and Pérez-Ortín 2000; Peng *et al.* 2015). Yeast transformation was carried out by electroporation, as described by Pourcelot *et al.* (2023). Transformants were selected on YPD agar supplemented with the appropriate antibiotic: 800 µg/mL of hygromycin B for *S. bacillaris*, 100 µg/mL of nourseothricin for *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, and *L. thermotolerans*, and 200 µg/mL of geneticin for *H. uvarum*. Integration at the locus was verified with two independent PCR

Supplementary Table 4), and fluorescence was checked by flow cytometry (Supplementary Figure 1). To check that transformation did not modify cells behavior, growth of WT strains and transformants were compared by microplate assay in SGM425 (Supplementary Figure 2).

c. Fermentations

Fermentations were run in pasteurized synthetic grape must in 1.2 L fermenters (200mL headspace) with automated weighing every 20 min to evaluate CO₂ weight loss. Synthetic grape must (SGM425) was prepared according to Bely *et al.* (1990) with 100 g/L of glucose, 100 g/L of fructose and 425 mg/L of yeast assimilable nitrogen (as a mixture of amino-acids and ammonium), supplemented with 5 mg/L of phytosterols (Beta-sitosterol, Sigma, St-Louis, US, MO) and a final pH of 3.3. Fermenters were aerated before being inoculated with a total cell concentration of 10⁶ cells/mL. Cell cultures were prepared with a first propagation in 5mL YPD for 18 hours at 28°C, and a second propagation of 1 mL in 50 mL of SGM425 for 24 hours at 28°C with agitation. Cell concentration for each pre-culture was measured by cytometry before inoculation and appropriate cell volume of each species' cultures were inoculated. In the case of the consortium, cells were mixed to obtain initial proportions: 35% *H. uvarum* (3.5 × 10⁵ cells/mL), 25% *M. pulcherrima* (2.5 × 10⁵ cells/mL), 20% *S. bacillaris* (2 × 10⁵ cells/mL), 10% *S. cerevisiae* (1 × 10⁵ cells/mL), 5% *T. delbrueckii* (0.5 × 10⁵ cells/mL), 5% *L. thermotolerans* (0.5 × 10⁵ cells/mL). Cell suspensions were centrifuged at 4415 g for 5 min and washed in physiological water (9 g/L of sodium chloride, Sigma), and suspended in 5 mL of MS425 for inoculation. An internally developed software was used to measure online the rate of CO₂ production (g/L/h), and fermentations were stopped when it was smaller than < 0.02 g/L/h, or after 312 hours if fermentation had not finished yet. From these CO₂ data, four kinetic parameters could be calculated: the maximum production of CO₂ (CO₂max, in g/L), the maximum rate of production of CO₂ (Vmax, in g/L/h), the time when this maximum production of CO₂ is reached (tVmax, in h) and the time to produce more than 0.02 g/L of CO₂ (latency).

d. *Population dynamic*

During fermentation, population cell number was monitored by flow cytometry with the Attune NxT™ Thermofisher® Flow Cytometer. At the different time points, 6 mL of fermenting must were sampled, knowing the total volume variation was of 5% at the end of fermentation. Two hundred microliters of cells were washed with 200 μ L of PBS (130 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, pH 7.4; Sigma) after centrifugation in microplate (V-bottom) at 4415g for 5 min. Samples were diluted in PBS before reading so that the cell concentration was approximately $5 \cdot 10^5$ to $1 \cdot 10^6$ cells/mL. Total cell count was measured with the FSC and SSC channels (488 nm laser, 488/10 filter). To restore the fluorescence of cells, likely lost due to the low oxygen content during fermentation, cells suspended in PBS were kept at room temperature for 2 hours. This step did not impair total cell count or viability (data not shown). After this aeration step, each population tagged with one or two fluorescent protein was detected with a specific set of channels described in **Table 2**. Viability was assessed after staining cells with 1 μ g/mL propidium iodide (PI, stored at 4°C protected from light; Calbiochem). Cell number and percentage were obtained from gatings done on the Attune NxT software.

e. *Metabolites analysis*

At the different time point, 5 mL of samples were centrifuged 5 min at 4415 g at 4°C to get rid of cells. Supernatant aliquots were kept at -18°C before being diluted with 2.5 mM sulfuric acid (H₂SO₄, Merck, Darmstadt, Germany) at 1:6, and centrifuged again at 16000 g for 5 min. Diluted samples were kept at -18°C until analysis. Extracellular metabolite and sugar concentrations (glucose, fructose, ethanol, glycerol, acetic acid, lactic acid, pyruvic acid, and α -ketoglutaric acid) were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC), following the method described in Deroite et al. (2018). Analyses were run on the HPLC (HPLC 1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) using a Rezex ROA ion exclusion column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) at 60°C, with a flow rate of 0.6 mL/min of 2.5 mM H₂SO₄. Concentrations of acetic acid, lactic acid and α -ketoglutaric acid have been measured with a UVmeter at 210 nm and other compounds with a refractive index detector and chromatograms were analyzed on OPEN LAB 2X software. Fermentation samples were

analyzed with technical duplicates and data analysis were carried out on the mean of both replicates.

Table 2: Description of the set of channels (with dichroic filters details) used for the detection of the different populations considered in this study. Voltages were set using fluorescent and wild type cells to ensure a proper signal of both. The fluorescence phenotype of each strain is indicated with + (fluorescent) and – (non-fluorescent) on the corresponding channel. Viability was measured using Propidium Iodide (PI).

Population	Fluorochrome	Channel	Voltage	Fluorescence
Dead cells	PI	BL3 (488 – 695-40)	340	+
Live cells	PI	BL3 (488 – 695-40)	340	-
<i>S. cerevisiae</i>	mCherry + GFP	YL2 (600DLP-620/15)	320	+
		BL1 (495DLP-530/30)	260	+
<i>L. thermotolerans</i>	mCherry	YL2 (600DLP-620/15)	320	+
		BL1 (495DLP-530/30)	260	-
<i>S. bacillaris</i>	mCitrine	BL1 (495DLP-530/30)	260	+
		VL2 (495DLP-512/25)	400	-
<i>T. delbrueckii</i>	EGFP	BL1 (495DLP-530/30)	260	+
		VL2 (495DLP-512/25)	400	-
<i>H. uvarum</i>	mTagBFP2	YL2 (600DLP-620/15)	320	-
		BL1 (495DLP-530/30)	260	-
		VL1 (417LP-440/50)	340	+
<i>M. pulcherrima</i>		YL2 (600DLP-620/15)	320	-
		BL1 (495DLP-530/30)	260	-
		VL1 (417LP-440/50)	340	-

f. Data analysis

Mock communities were analyzed by comparing theoretical cell concentration to the observed cell concentration, as measured by cytometry. Each community was constructed in triplicate.

Fermentations of the six monocultures and consortium were compared based on 10 parameters. They included four kinetics parameters - latency (time needed to reach 5 g/L of total produced CO₂), time of fermentation (tF, time when CO₂ production rate < 0.02 g/L/h), maximum CO₂ production rate (Vmax) - and six metabolic parameters, namely the yields of ethanol, glycerol, and acetic, α-ketoglutaric, lactic and pyruvic acids. Metabolite yields were calculated with the formula:

$$Y_{\text{metabolite}} = \frac{\text{Final metabolite concentration (g/L)}}{\text{Initial sugar concentration (g/L)} - \text{Final sugar concentration (g/L)}} \quad (1)$$

All fermentations were done in biological triplicates, on three different runs.

Data were analyzed with R studio software (version 4.3.1, R Core Team 2023). Mock communities' data were analyzed with the *'ggpmisc'* package (Aphalo 2023). ANOVA were performed to compare the different monocultures and consortium parameters, followed by a *post hoc* Tukey test when significant using the *'rstatix'* package (Kassambara 2023).

All data and scripts will be made available on a Zenodo repository.

Results and discussion

a. Construction of consortium and method optimization

The consortium that we used in this study was constituted of one strain of 6 different species at different initial abundance: *Saccharomyces cerevisiae* (10% of total population), *Hanseniaspora uvarum* (35%), *Metschnikowia pulcherrima* (25%), *Starmerella bacillaris* (20%), *Lachancea thermotolerans* (5%), and *Torulasporea delbrueckii* (5%). Species, strains and initial proportions were chosen following analysis of previous results from Pourcelot et al (2024, in prep) and correspond to the C4 consortium of this study.

Discrimination of species with fluorescent labelling. The consortium was designed aiming to track individually the six species during fermentation, especially in the first days when most population changes occur (Jolly et al., 2006). To this end, our strategy was to label the different species with different fluorescent proteins. Genes of the selected fluorescent proteins were successfully integrated by homologous recombination in fusion of the *TDH3* gene into the genomes of *H. uvarum* (mTagBFP2), *S. bacillaris* (EGFP), *L. thermotolerans* (mCherry) and *T. delbrueckii* (mCitrine). *S. cerevisiae* was tagged with mCherry fused with *TDH3* and eGFP with *ENO2* (Table 1). For *M. pulcherrima*, the WT strain was used since we did not manage to integrate genes at the locus even when using long homology sequences, which is in accordance with previous studies (Gordon et al., 2019; Moreno-Beltrán et al., 2021). The fluorescent proteins were selected based on their excitation and emission spectra to minimize overlaps. As shown on Figure 1, which displays derived dot plots and gates used in this study, the different transformants could be well discriminated. *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* are distinguished by the mCherry fluorescence and *S. cerevisiae* by the additional GFP fluorescence. As reported for YFP (Yellow Fluorescent Protein) by Marcus and Raulet (2013), *T. delbrueckii* (eGFP-tagged) cells could be separated from *S. bacillaris* (mCitrine-tagged) using

the violet laser, not needing the specific "YFP/GFP" optical configuration. Initially, the T-Sapphire fluorescent protein was also selected, but its signal overlapped onto the channel used for mTagBFP2 detection and was not used further.

Optimization and validation of the numbering method with cytometry. Small-scale fermentations of each species were run to optimize the cytometry numbering of populations. Indeed, after 24 hours of fermentation, a loss of cell fluorescence was observed, especially for the mCherry-tagged cells. To restore fluorescence, samples needed to be incubated at least 2 hours in PBS at room temperature, which was shown not to change total cell numbers nor viability. This incubation step likely enables the maturation of fluorescent proteins which is oxygen-dependent (Hansen *et al.* 2001; Zimmer 2002), while oxygen is rapidly depleted during fermentation (Bardi *et al.* 1999 ; Moenne *et al.* 2014).

In addition, accurate numbering of the different yeast populations was verified using mock communities. Mock communities are used to validate methods for microbial quantification, with metagenomics or cytometry, since they are constructed with known composition (Tourlousse *et al.* 2021; van de Velde *et al.* 2022). In this study, 6-species yeast mock communities were constructed from overnight cultures in SGM425 and included one species with theoretical abundance of either 1, 5, 10, 50 or 90% while the five other species were in equal proportions. In total, 30 communities were tested, with a final cell concentration of 10^6 cells/mL. Even though *T. delbrueckii* might be underestimated in monocultures due to slight flocculation and *M. pulcherrima* tended to decrease with longer incubation times, the theoretical and observed populations were well correlated ($R^2 = 0.95$, $p < 0.001$, Figure 2). The linear coefficient ranged between 0.8 and 0.99 for the different species. These data confirm the applicability of the combined use of fluorescently tagged cells and cytometry to follow the several species individually in œnological fermentations. Indeed, this method has been successfully applied in mixed fermentations of one non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* (Petitgonnet *et al.* 2019; Harlé *et al.* 2020), but rarely included more species. One notable exception is the study of Conacher *et al.*, 2020 that included up to four species. Other studies including more species in their consortium employ cultivation or molecular biology methods to follow the microbial dynamics (Lleixà *et al.* 2016; Bagheri *et al.* 2017; Chasseriaud *et al.* 2018). However, these methods involved heavier experiments and a longer time between sampling and results. Moreover, we observed a decrease in fluorescence of eGFP in

S. cerevisiae near the end of fermentation, reducing the accuracy of measurement after 144 hours of fermentation (up to 5% of inaccurate events at 144 hours) and needing an incubation of 1 hour in YPD (Breslow *et al.* 2008).

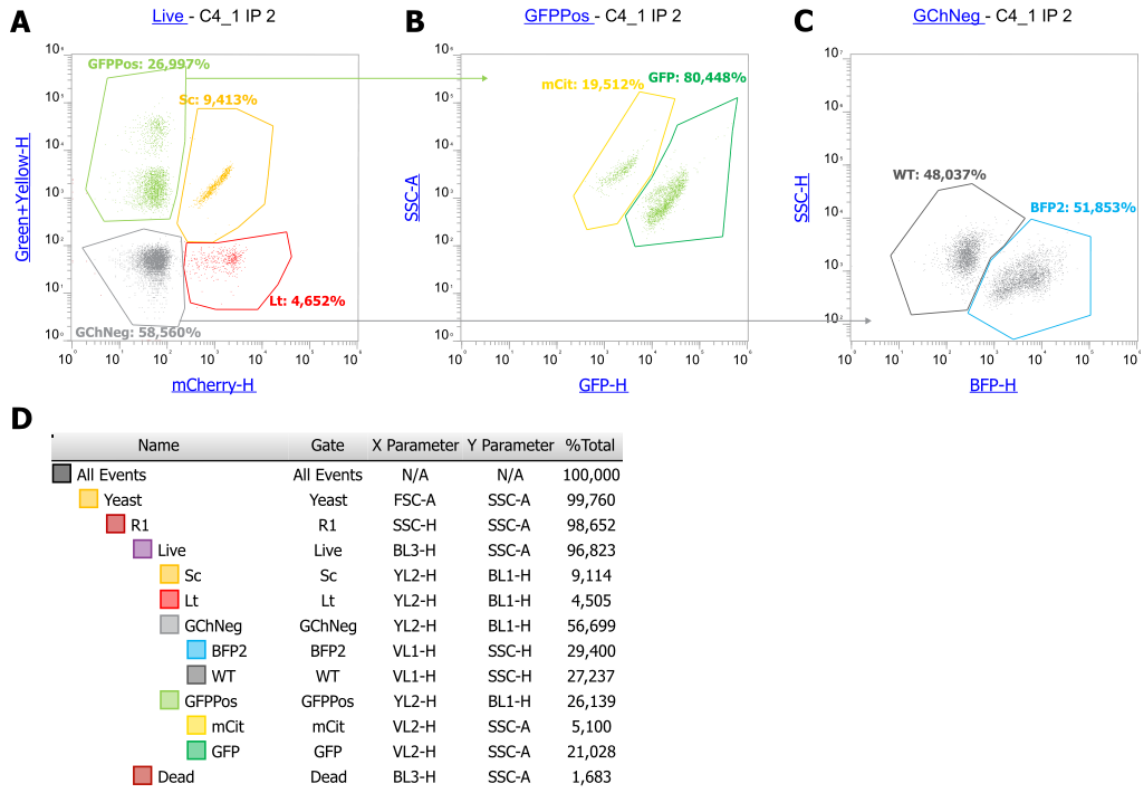


Figure 1: Cytometry set up with an example of a sample at inoculation. **A:** YL2 (600DLP-620/15)/BL1 (495DLP-530/30) dot plot is used to separate GFP positive and mCherry positive cells. **B:** VL2 (495DLP-512/25)/SSC dot plot derived from the GFPPos gate on A, is used to separate mCitrine (-) from eGFP signal (+). **C:** VL1 (417LP-440/50)/SSC dot plot derived from the GFPNeg gate on A, is used to separate non-fluorescent cells from BFP positive cells. **D:** Hierarchy of gating and percentage of each population. % Total indicates the % of the total population of events in the corresponding gate.

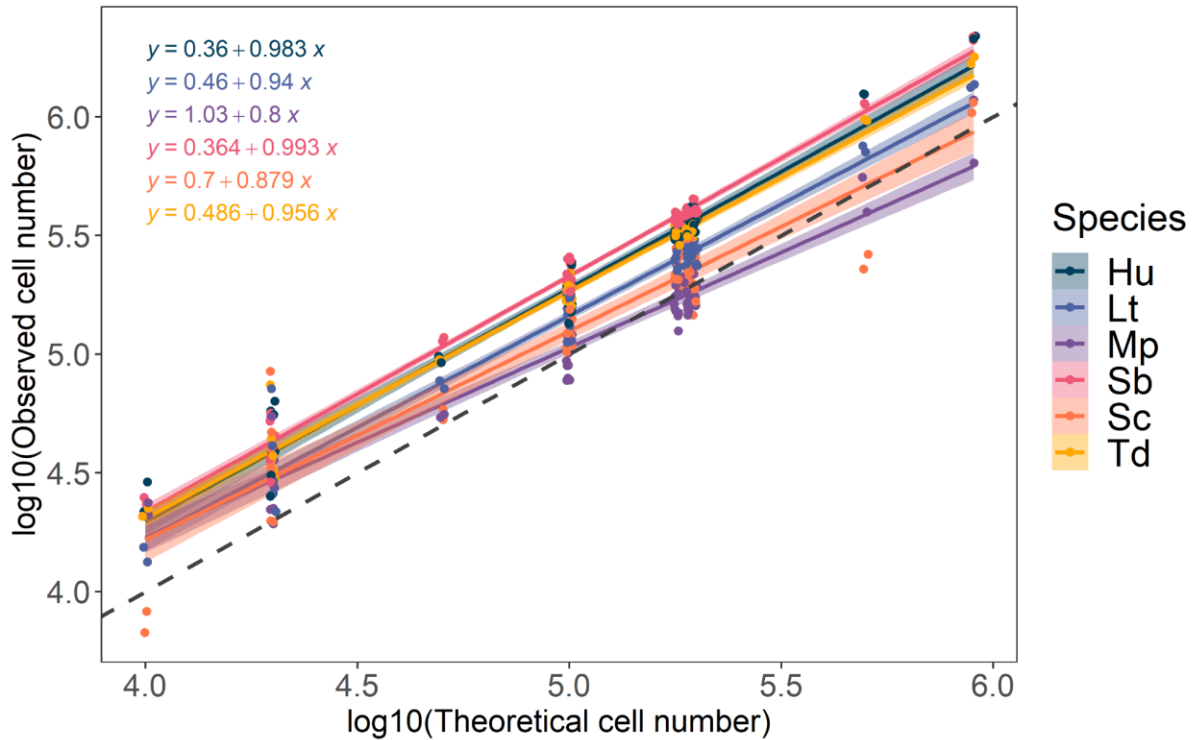


Figure 2: Comparison of observed population and theoretical population in mock communities. Linear equations between observed and theoretical populations are indicated for each species. Dashed line: $\log_{10}(\text{Observed cell number}) = \log_{10}(\text{Theoretical cell number})$. Overall correlation (Pearson): $R^2 = 0.95$, $p < 0.001$. Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Td: *Torulopsis delbrueckii*.

b. Fermentation kinetics and population dynamics of the consortium

Fermentation CO₂ kinetics of the consortium and monocultures. Fermentation power of the consortium (C4) and its constituent species alone was evaluated through CO₂ production (Figure 3). The consortium performance was similar to that of *S. cerevisiae* alone, with a slightly longer latency and fermentation time (latency = 25.3 ± 1.9 h and $t_F = 158.5 \pm 6.1$ h compared to 18.7 ± 0.7 and 120.6 ± 3.9 h for *S. cerevisiae*, respectively, Supplementary Table 5). The maximum CO₂ rate (V_{max}) of consortium C4 was significantly different from any monocultures. It reached 1.74 ± 0.0591 g/L/h (Figure 3B), which was between the maximum CO₂ rate of *S. cerevisiae* (2.16 ± 0.02 g/L/h), *T. delbrueckii* (1.11 ± 0.11 g/L/h) and *L. thermotolerans* (1.01 ± 0.06 g/L/h) alone. The consortium reached the same total CO₂ production as *S. cerevisiae* (93.08 ± 1.06 g), while *M. pulcherrima*, *H. uvarum*, and *S. bacillaris* showed the smallest CO₂ production (Figure 3B), which is likely due to the fact they do not metabolize all sugars. These results are similar to other studies that have shown that co-

inoculation presents intermediate fermentation power (Renault *et al.* 2013; Bagheri *et al.* 2017; Harlé *et al.* 2020).

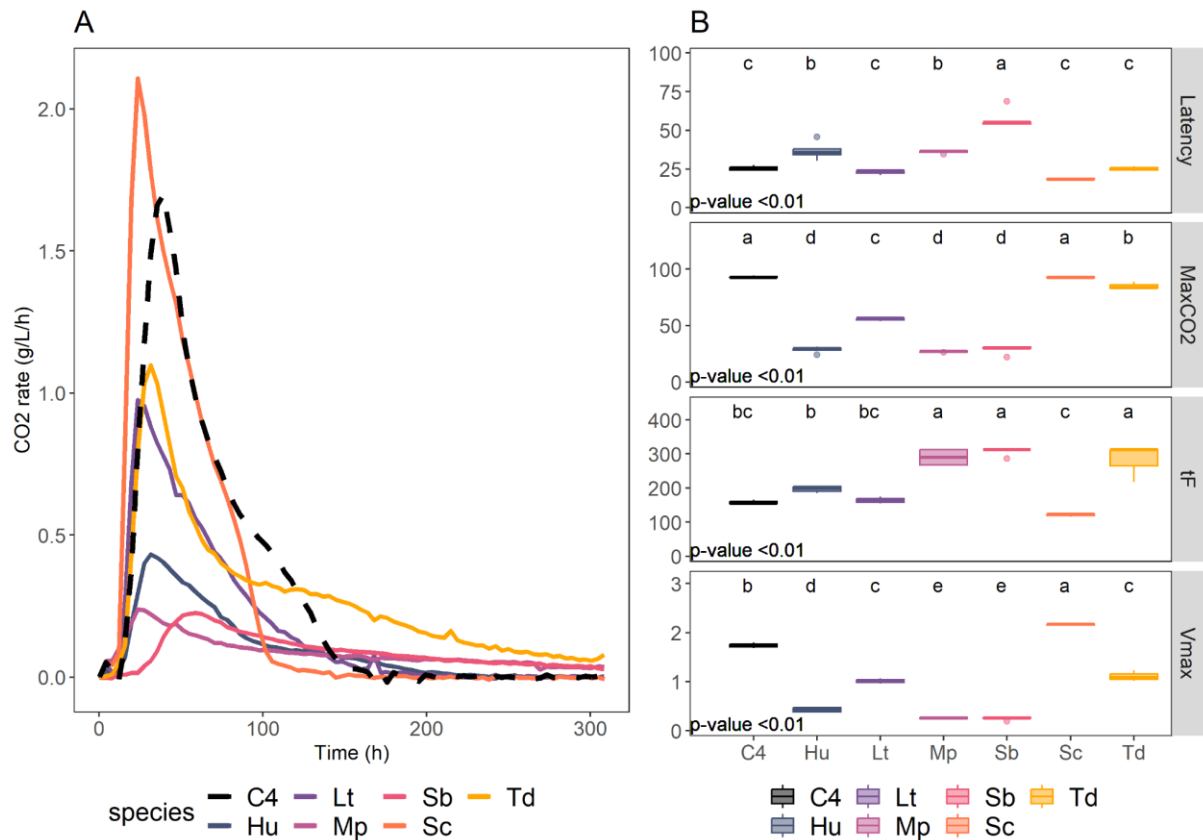


Figure 3: Fermentation kinetics of monocultures and consortium C4. **A:** CO₂ production rate kinetics of each monoculture (solid line) and consortium C4 (dashed line). Smoothing with the Loess method was applied on the results of triplicates. **B:** Kinetics parameters obtained from CO₂ loss. MaxCO₂ = maximum CO₂ produced (in g/L); tF = fermentation time (time to reach CO₂ production rate < 0.02 g/L/h), Vmax = maximum rate of CO₂ production, and Latency = time necessary for total CO₂ production to 5 g/L. ANOVA results are indicated by the p-value. Statistical groups determined with post-hoc Tukey tests are indicated with lowercase letters. C4: Consortium, Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Td: *Torulaspora delbrueckii*.

Metabolite production across fermentation. Next, we analyzed the evolution of the concentration of sugars and metabolites from the central carbon metabolism during fermentation. Once again, the consortium followed the trend of *S. cerevisiae* alone with a delay (Figure 4), showing the same end yields in ethanol (0.499 ± 0.001), acetic acid (0.002 ± 0.00), lactic acid (0.003 ± 0.00), and succinic acid (0.003 ± 0.00) as *S. cerevisiae* was alone at the end of fermentation (Figure 5). Both the consortium and *S. cerevisiae* monoculture reached dryness (total residual sugars < 2g/L), and *T. delbrueckii* left 15.3 ± 5.28 of residual

sugars. Other non-*Saccharomyces* left between 80 ± 3.32 g/L for *L. thermotolerans* and 137 g/L of residual sugars for *M. pulcherrima* and *H. uvarum*. Some difference can also be seen for the α -ketoglutaric acid release by the consortium, which seemed to be produced more slowly than *S. cerevisiae* monoculture (Figure 4) but reached a yield similar to monocultures of *S. cerevisiae*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* or *H. uvarum* ($Y_{\alpha\text{-keto}, C4} = 1.94\text{e-}04 \pm 8.66\text{e-}06$, Supplementary Table 5). *M. pulcherrima* and *S. bacillaris* monocultures overproduced α -ketoglutaric acid in monoculture ($Y_{\alpha\text{-keto}, Mp} = 28.6\text{e-}04 \pm 5.9\text{e-}04$ g/g, $Y_{\alpha\text{-keto}, Sb} = 15.8\text{e-}04 \pm 1.4\text{e-}04$ g/g, Figure 5 and Supplementary Table 5), as already described in synthetic must (Englezos *et al.* 2018; Mbuyane *et al.* 2022). Similarly, we found that *M. pulcherrima* and *S. bacillaris* had the two highest glycerol yields ($Y_{\text{glycerol}, Mp} = 0.068 \pm 0.004$ g/g, $Y_{\text{glycerol}, Sb} = 0.096 \pm 0.002$ g/g, Figure 5 and Supplementary Table 5). These two species are often associated with higher final concentrations of glycerol in mixed fermentations (Comitini *et al.* 2011; Englezos *et al.* 2017; Binati *et al.* 2020; Seguinot *et al.* 2020). Despite that and their high initial abundance in the consortium (45% in total), their early disappearance likely prevented them from producing noticeable amounts of α -ketoglutaric acid and glycerol in the consortium.

In the consortium, pyruvic acid was produced in the first 48 hours of fermentation (reaching 0.166 ± 0.005 g/L) then almost entirely consumed at the end (0.023 ± 0.001 g/L, Supplementary Table 5A). Monocultures of *S. cerevisiae*, *L. thermotolerans*, and *H. uvarum* showed a similar behavior, reaching respectively a maximum concentration of 0.230 ± 0.013 g/L at 48h, 0.050 ± 0.008 at 24h, 0.153 ± 0.007 at 48h (Figure 4, Supplementary Table 5). For *S. cerevisiae* alone, production followed by consumption of pyruvic acid seems related to the exhaustion of carbon source (Morata *et al.*, 2003; Whiting, 1976), though the maximum concentration was much inferior (0.1 g/L). This has also been reported in *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, and *M. pulcherrima* monocultures and mixed fermentations (Benito *et al.*, 2015; Mateus *et al.*, 2020). On the contrary, *S. bacillaris* and *T. delbrueckii* seemed to produce pyruvic acid without switching to consume it (Figure 4). Indeed, *S. bacillaris* is already known to reroute metabolism towards pyruvic acid production and glycerol for redox equilibrium (Magyar *et al.* 2014; Englezos *et al.* 2018). This may also be related to differences in nitrogen or vitamin requirements, since both have been reported to modify the production balance of pyruvic acid in *S. cerevisiae* (Fleet 1993).

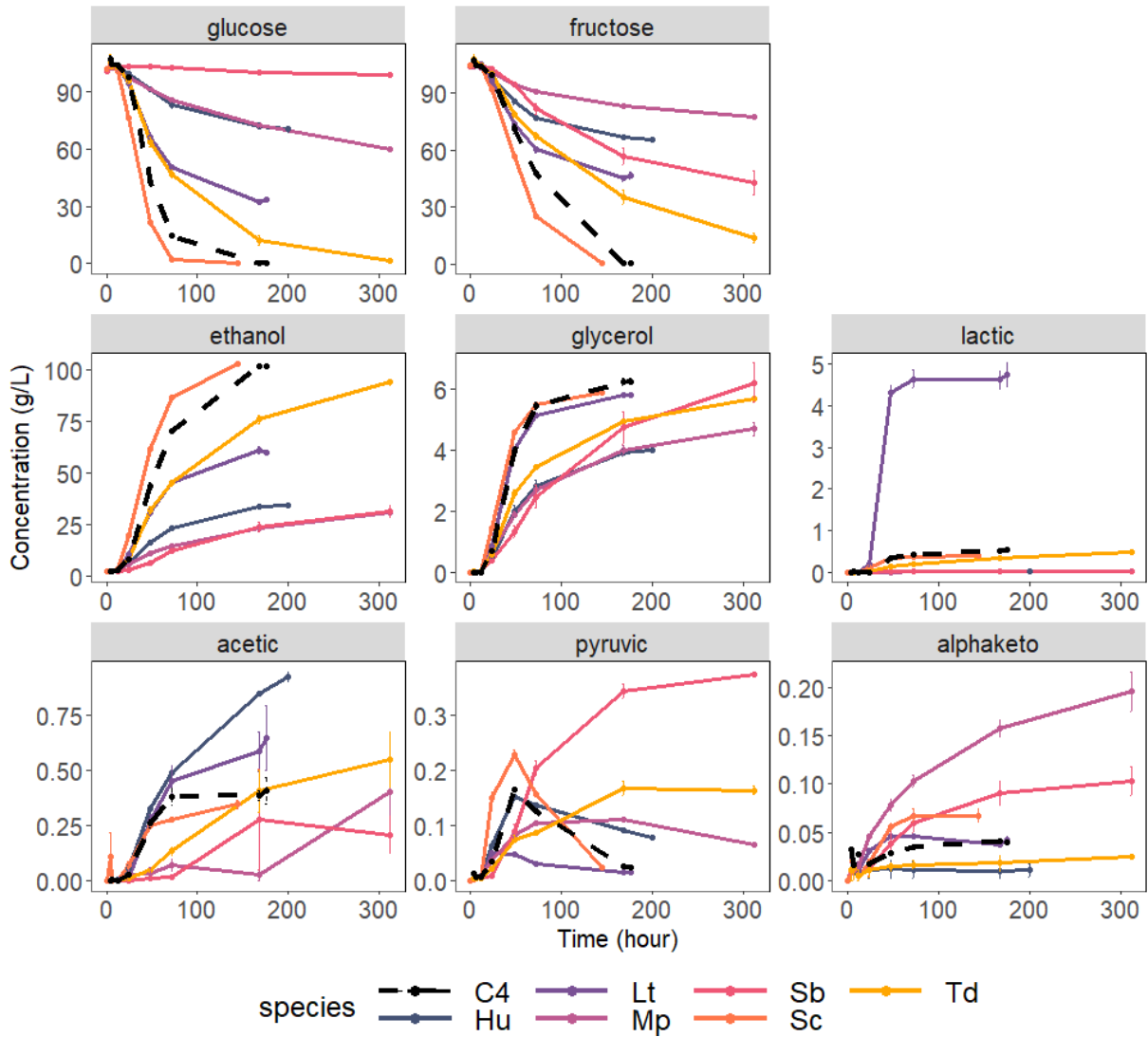


Figure 4: Kinetics of consumption and production of central carbon metabolites monocultures and consortium. C4: Consortium, Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Td: *Torulaspota delbrueckii*.

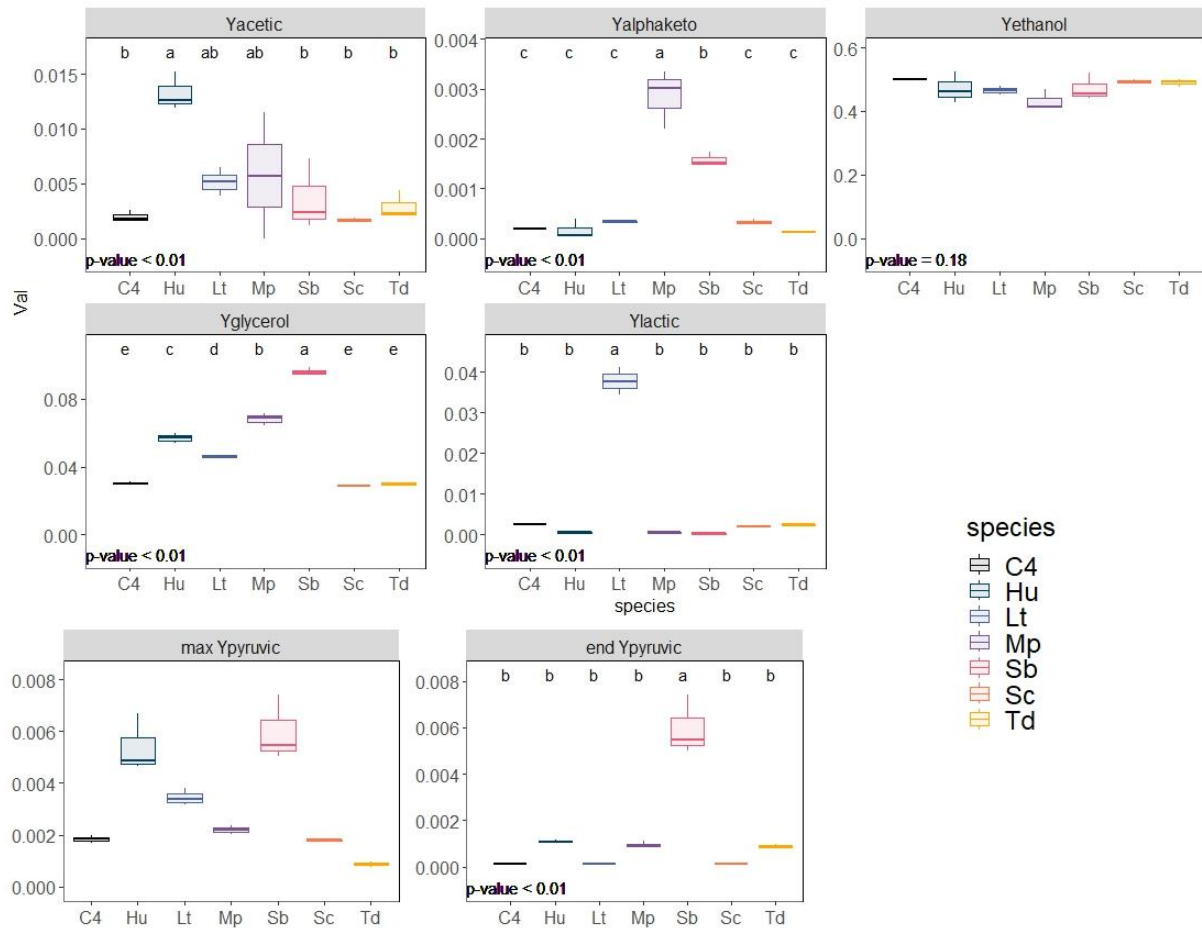


Figure 5: Final yield (in g of metabolite/g of consumed sugar) for metabolites of the different species and consortium C4 (in black). For pyruvic acid, both the end yield (endYpyruvic), and yield at the maximum concentration (max Ypyruvic) are displayed. ANOVA results are indicated by the p-value. Statistical groups determined with post-hoc Tukey tests are indicated with lowercase letters. C4: Consortium, Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Td: *Torulaspora delbrueckii*.

Characterization of the population dynamics in the consortium and monocultures.

Population dynamics of the consortium C4 are shown in

Figure 6, and population dynamics of monocultures in Supplementary Figure 3. In the consortium, the early fermentation phase was characterized by a rapid growth of *H. uvarum* that reached 65% of the total population at 12 h, with a maximum population of 6.7 log of cells/mL (

Figure 6, Supplementary Table 6). On the contrary, *S. bacillaris* and *M. pulcherrima* abundance dropped under 5% after 12 hours, even though they were inoculated at 20 and 25%, respectively. This was related to an absence of growth for both species (Supplementary Table 6). *L. thermotolerans*, meanwhile, showed a little growth at 24h, reaching 6.3 log of

cells/mL, Supplementary Table 6), but quickly decreased after 48 hours. *S. cerevisiae* became dominant in the consortium after 24 hours and represented 41% of the total population and 58% of the live population (

Figure 6). Increase in *S. cerevisiae* was associated with a drop in viability (live cells < 75%), which was not observed in monocultures at this time, or at the same ethanol concentration (8.2 ± 1.1 g/L; Figure 4). Maximum population (8 log) in consortium was reached after 48 h, and almost only *S. cerevisiae* remained alive in the consortium (

Figure 6). These results are consistent with previous works on cocultures that found that non-*Saccharomyces*, such as *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* or *M. pulcherrima*, populations tended to decrease once *S. cerevisiae* reached a high cell number or a high cell number of live *S. cerevisiae* was added (Nissen *et al.* 2003; Kapsopoulou *et al.* 2005; Comitini *et al.* 2011; Taillandier *et al.* 2014). This phenomenon is also evidenced in sequential inoculation when non-*Saccharomyces* stop growing or even die after the addition of *S. cerevisiae* (Benito *et al.* 2015; Binati *et al.* 2020; Seguinot *et al.* 2020).

The overall population dynamics of the consortium C4 described in this study reflects results found in both natural communities and laboratory cocultures. For example, as observed in our data, several studies have reported a fast multiplication of *H. uvarum* in early fermentation, including studies in cocultures and consortia (four species) grown in synthetic grape must (Lleixa, 2016; Harlé, 2020), but also at industrial scale non-inoculated fermentations (Combina, 2005). However, in industrial conditions, this increase of *H. uvarum* can be limited when treating must with SO₂, which is a chemical commonly used as an antimicrobial and antioxidant agent, promoting *S. cerevisiae* (Grangeteau *et al.* 2017). After 24 hours, *M. pulcherrima* and *S. bacillaris* were detected under 5 % in our consortium. This early decline of *M. pulcherrima* in fermentation has been observed previously (Chasseraud *et al.*, 2018; Combina *et al.*, 2005), whereas several studies have found *S. bacillaris* able to multiply and maintain a relatively high population in cocultures. Indeed, in semi-industrial scale fermentations, *S. bacillaris* could be found in mid fermentation. However, this was related to a later onset of *S. cerevisiae* (Ocón *et al.*, 2010). For other model consortia containing 8 species, tested in both synthetic and natural grape must, *S. bacillaris* remained present up to the mid or end of fermentation (Bagheri *et al.*, 2017). Discrepancies on the

presence of *S. bacillaris* during fermentation might be due to different media composition, as was demonstrated with different initial sugar and nitrogen content (Lleixà et al., 2016).

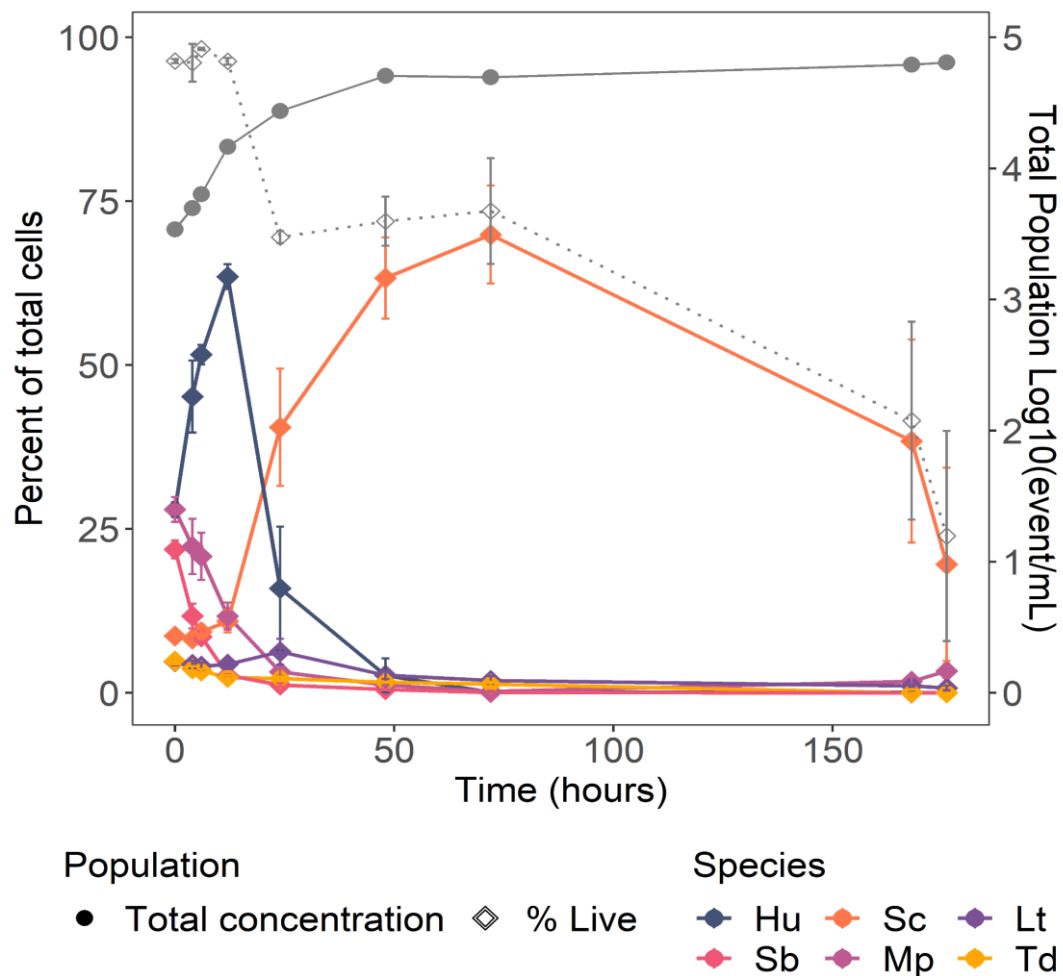


Figure 6: Individual growth of the different species in consortium C4. The grey solid line corresponds to the cell concentration $\log_{10}(\text{cells/mL})$, the grey dotted line to the percent of live cell. Solid color lines describe the percent of the different species. Initial abundances were: 10 % *S. cerevisiae* (*Sc*), 35% *H. uvarum* (*Hu*), 25% *M. pulcherrima* (*Mp*), 20% *S. bacillaris* (*Sb*), 5% *L. thermotolerans* (*Lt*), and 5% *T. delbrueckii* (*Td*).

Regarding *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii*, they were detectable up to 72 hours in our consortium, despite their low inoculation ratio, showing a rather good persistence. In a four species consortium, these two species were able to reach a sizable population despite the presence of *S. cerevisiae*. However, their inoculation ratio was much higher (Conacher et al., 2020). Similarly, *L. thermotolerans* was also found at the end of fermentation of Chenin Blanc grape must, in a consortium of eight species (Bagheri et al., 2017). In natural communities, their maintenance is harder to evaluate since they are present in only low

abundance. However, they have been found in middle fermentations (Sternes et al., 2017) and in some occasions at the end of fermentation (Díaz *et al.* 2013; Simonin *et al.* 2018).

In this study, we successfully developed a 6-species consortium of fluorescently tagged wine yeasts that allow accurate real time tracking of species subpopulations during fermentation. The consortium was also fully characterized in terms of population dynamics and phenotype, such as metabolite production and fermentation kinetics. This consortium will be shared with the community and could be a valuable resource for applications in yeast ecology. This consortium has the potential to support future research aimed at investigating the influence of stress factors relevant to the fermentation process, particularly when using multispecies starters. Factors such as oxygen availability, nitrogen levels, temperature and the use of SO₂ are critical parameters influencing the presence of non-*Saccharomyces*, often having species-specific effects. Consequently, the trends observed with the C4 consortium and the accuracy of our methodology could be applied and tested under a wider spectrum of environmental conditions. Ultimately, the insights gained from studying population dynamics might provide strategies to mitigate fermentations by managing the yeast population.

Declaration of interests

None to declare

Acknowledgements

We are thankful to the CIRM Levures for providing the yeast strains. We are thankful to: F. Macna for carrying out the HPLC analysis, D. Segond for his support with cytometry analysis, F. Bauer and C. Conacher for their advice on the design of fluorescent strains.

Supplementary Data

Supplementary Table 1: List of plasmids

Plasmid Name	Features	Purpose	Origin	AddGene Ref or Lab Ref
pFA6a-link-yoEGFP-Kan	pFA6 backbone, yeast optimised EGFP, Kanamycin resistance gene	Plasmid construction: Backbone & Cassette GFP	Lee et al., 2013	#44900
pFA6a-link-yomTag-BFP2-Kan	pFA6 backbone, yeast optimised mTagBFP2, Kanamycin resistance gene	Plasmid construction: Cassette mTagBFP2	Lee et al., 2013	#44899
pFA6a-TEF2Pr-eGFP-ADH1-NATMX4	pFA6 backbone, EGFP with TEF2 promoter, Nourseothricin resistance gene	Plasmid construction: Cassette NATMX	Breslow et al., 2008	MTF2559
pFA6a-link-yEmCitrine-Hygro	pFA6 backbone, yeast optimised monomeric Citrine, Hygromycin resistance gene	Plasmid construction: Cassette mCitrine & HPHMX	Sheff et al., 2004	#44645
pFA6a-link-yEmCitrine-NATMX	pFA6 backbone, yeast optimised monomeric Citrine, Nourseothricin resistance gene	Plasmid construction: Cassette mCitrine & NATMX	This study	MTF4991
pFA6a-link-yomCherry-Kan	pFA6 backbone, yeast optimised mCherry, Kanamycin resistance gene	Transformation Sc & Plasmid construction mCherry KANMX cassette	Lee et al., 2013	#44903
pFA6a-link-yEGFP-NAT1	pFA6 backbone, yeast optimised EGFP, Nourseothricin resistance gene	Transformation Sc & Plasmid construction GFP NATMX cassette	Pourcelot et al., 2023	MTF4882
pFA6-TDH3.1kb.Sb-GFP-HPHMX	pFA6 backbone, yeast optimised EGFP, Hygromycin resistance gene, homologous sequence of 1 kb specific to <i>S. bacillaris</i> TDH3 ortholog	Transformation Sb	Pourcelot et al., 2023	MTF4888
pFA6-Hu1kb-BFP2-KAN	pFA6 backbone, yeast optimized mTagBFP2, Kanamycin resistance gene, homologous sequence of 1 kb specific to <i>H. uvarum</i> TDH3 ortholog	Transformation Hu	This study	MTF4993
pFA6-TDH3.1kb.Td-mCitrine-NATMX	pFA6 backbone, yeast optimised mCitrine, Nourseothricin resistance gene, homologous sequence of 1 kb specific to <i>T. delbrueckii</i> TDH3 ortholog	Transformation Td	This study	MTF4997
pFA6a-link-yomCherry-NATMX	pFA6 backbone, yeast optimised mCherry, Nourseothricin resistance gene	Transformation Lt	This study	MTF4883

Supplementary Table 2: List of primers used for the construction of plasmid by Gibson Assembly. Plasmid name indicates the constructed plasmid. **Bold nucleotides:** sequence homologous to the template DNA.

Plasmid name	Primer name	Sequence (5'→3')	Template DNA	Ref Template
pFA6a-link-yEmCitrine-NATMX	FPF_FP-NAT	tgagcatgccctgcccta atcag tactgacaataaaaaga	pFA6a-link-yEmCitrine-Hygro	#44645
	FPR_FP-NAT	tcgtcaagagtgtaccat gggtgtttatgttc gatgt		
	NATF_FP-NAT.lg	acatccgaacataaacaac catgggtaccactcttgac gac	pFA6a-TEF2Pr-eGFP-ADH1-NATMX4	MTF2559
	NATR_FP-NAT.lg	ctttttatgtcag tactgattagg ggcagggcatgctca		
pFA6-Hu1kb-BFP2-KAN	pFA6-TDH3-Hu1kb-For	atttctaaactttttat tgat atcagatccactag tg gcct	pFA6a-link-yoEGFP-Kan	#44900
	pFA6-TDH3-Hu1kb-Rev	ccgaaaccgta atg gaaac gatcc gtcgac ctg cagc gt		
	H1-TDH3-Uni1kb-For	acgctgcaggtcgacggat cag ttgct atta acg ttt cgg	<i>H. uvarum</i> CLIB3221	CLIB3221
	H1-TDH3-Hu1kb-Rev	attaaccagcaccgtcacc gttctt gaaa actg ttcga		
	HR-ForHu	gataacgaatcgg tact ccaccag ttgtg acttagtcgaacacg tttca agaac gg tgac gtg ctg tt aat	pFA6a-link-yomTag-BFP2-Kan	#44899
	HR-RevHu	ta atcag ttaaaaaagaaaaaggacaaat atc tttttaga att ttttgacta attc gat ga attc gag ct g tt		
	H2-TDH3-Hu1kb-For	aacgagctcga attc atcga attag tcaaaa ata attc ta aaaa agg	<i>H. uvarum</i> CLIB3221	CLIB3221
	H2-TDH3-Hu1kb-Rev	cactag tg gatctgat atca tata aaa ag tt ta aga ata aa acga		
pFA6-TDH3.1kb-Td-mCitrine-NATMX	pFA6-TDH3-Td1kb-For	ccaatgaagcataaga ata at gat atcagatccactag tg gcct	pFA6-GFP-NATMX	MTF4882
	pFA6-TDH3-Td1kb-Rev	ccgaaaccgta atg caat gatcc gtcgac ctg cagc gt		
	H1-TDH3-Uni1kb-For	acgctgcaggtcgacggat cag ttgct atta acg ttt cgg	<i>T. delbrueckii</i> CLIB3069	CLIB3069
	H1-TDH3-Td1kb-Rev	attaaccagcaccgtcaccag ag gca actg ttcaa		
	HR-ForTd	gacaacgaatcgg tact ctaccag ttgtg acttg ttg aaacacg ttg ctct g ct gg tgac gtg ctg tt aat	pFA6a-link-yEmCitrine-NATMX	MTF4991
	HR-RevTd	taaa atg tcattaa aa agtga aaa agcttga aa actct tt ctca act aat ctc gat ga attc gag ct g tt		
	H2-TDH3-Td1kb-For	aacgagctcga attc atcga attag ttgagaa ag at	<i>T. delbrueckii</i> CLIB3069	CLIB3069
H2-TDH3-Td1kb-Rev	cactag tg gatctgat atca t ttct atg ctt catt g ga			

Supplementary Table 3: Description of primers and PCR cycles used for the amplification of cassettes. UPPERCASE: Sequence homologous to integration locus, **bold nucleotides:** Sequence homologous to plasmid. Enzyme: KAPA HiFi HotStart Enzyme (Roche KK2502) or Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)

Target species	Primer name	Sequence (5'→3')	PCR cycle	Enzyme
<i>S. cerevisiae</i> - TDH3	HR-ForSc	GACAACGAATACGGTTACTCTACCAGAGTTGTCGACTTGGTTGAA CACGTTGCCAAGGCT ggtgacggtgctggttaat	95°C - 3 min [98°C - 20 sec 65°C - 15 sec 72°C - 1 min 45] x 30 72°C - 2 min	KAPA
	HR-RevSc	CTAAGTCATAAAGCTATAAAAAGAAAATTTTAAATGCAAGAT TTAAAGTAAATTCAC Tc gatgaattcgagctcgtt		
<i>S. cerevisiae</i> - ENO2	HR_ENO2_Sc1152_For	GAAGAATTGGGTGACAAGGCTGTCTACGCCGGTGAAAACCTCCA CCACGGTGACAAGTT ggtgacggtgctggttaat	95°C - 3 min [98°C - 20 sec 65°C - 15 sec 72°C - 1 min 45] x 30 72°C - 2 min	KAPA
	HR_ENO2_Sc1152_Rev	GTTCTAAACTATGATGAAAAATAAGCAGAAAAGACTAATAATTC TTAGTAAAAGCACT Tc gatgaattcgagctcgtt		
<i>L. thermotolerans</i>	HR-ForLt	GACAACGAGTACGGTTACTCTACCAGAGTTGTCGACTTGGTTGA GCACGTGCCAGCGCC ggtgacggtgctggttaat	95°C - 3 min [98°C - 20 sec 65°C - 15 sec 72°C - 1 min 45] x 30 72°C - 2 min	KAPA
	HR-RevLt	TATCAAGTCGTTAGATTTCTGTTATAAAAAATGCTTACGTAAAAAT GTGTATCACGGAG Tc gatgaattcgagctcgtt		
<i>T. delbrueckii</i>	K7-HR-TDH3.1kb-Td-For	ATTGCTATTAACGGTTTCGGT	95°C - 30sec [98°C - 30 sec 55°C - 15 sec 72°C - 2min10]x30 72°C - 5min	KAPA
	K7-HR-TDH3.1kb-Td-Rev	TTATTCCTATGCTTCATTGGAT		
<i>S. bacillaris</i>	K7-HR-TDH3.1kb-Sb-For	GTTGGTATTAACGGTTTCGGTC	98°C - 30sec [98°C - 10 sec 62.4°C - 20 sec 72°C - 2min21]x35 72°C - 5min	Phusion
	K7-HR-TDH3.1kb-Sb-Rev	TTTGTGACCTCGTCGGCTCC		
<i>H. uvarum</i>	K7-HR-TDH3.1kbHu-For	GTTCCATTAACGGTTTCGGG	98°C - 30 sec [98°C - 10 sec 57°C - 20 sec 72°C - 2 min 15] x 30 72°C - 4 min 30	Phusion
	K7-HR-TDH3.1kbHu-Rev	ATATAAAAAGTTTAAGAAATAAACGA		

Supplementary Table 4: List of primers and PCR cycles details for the verification of the correct integration of cassettes at the locus. * Polymerase used for all amplifications: Taq Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Ref ep0402). UPPERCASE: primers annealing outside of the integrated cassette, at the target locus, lowercase: primer annealing in the cassette.

Target species	Primer name	Sequence (5'→3')	Primer pair	PCR cycle*	
Cassette - universal	C	acagtcacatcatgccccctg			
	D	cacacctctaccggcagatc			
<i>S. cerevisiae</i> - TDH3	A-Hu	GGTATGGCTTTCAGAGTCCCA	A-Hu + C	95°C – 5 min	
				[95 °C – 30 sec	
	B-Sc	TCAGAATCGTTATCCTGGCGG	B-Sc + D	55 °C – 30 sec	
				72 C – 1 min 30] x30	
				72°C – 5 min	
				95°C – 5 min	
				[95 °C – 30 sec	
				50 °C – 30 sec	
				72 C – 2 min] x30	
<i>S. cerevisiae</i> - ENO2	A_verif_ENO2_Sc	CTGTCACCAACCCAGCTAGA	A_verif_ENO2_Sc + C_verif_ENO2_Sc	72°C – 5 min	
				95°C – 5 min	
	C_verif_ENO2_Sc	gctaaatgtacggcgacag			[95 °C – 30 sec
					53 °C – 30 sec
	B_verif_ENO2_Sc	CACTTTGTCGGCTTGGTTGA	B_verif_ENO2_Sc + D_verif_ENO2_Sc		72 C – 2 min] x35
					72°C – 5 min
	D_verif_ENO2_Sc	acagttctcacatcacatccg			With TAKARA enzyme
					95°C - 5 min
				[98°C - 10 sec	
				55°C - 30 sec	
				72 °C - 2 min] x35	
				72°C - 7 min	

Supplementary Table 4 (continued): List of primers and PCR cycles details for the verification of the correct integration of cassettes at the locus. * Polymerase used for all amplifications: Taq Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Ref ep0402). UPPERCASE: primers annealing outside of the integrated cassette, at the target locus, lowercase: primer annealing in the cassette.

Target species	Primer name	Sequence (5'→3')	Primer pair	PCR cycle*
<i>L. thermotolerans</i>	A-Hu	GGTATGGCTTTCAGAGTCCCA	A-Hu + C	95°C – 5 min
				[95 °C – 30 sec
				55 °C – 30 sec
				72 C – 1 min 30] x30
	B-Lt	GAGGAGGTGAAGGTGCAGAG	B-Lt + D	72°C – 5 min
				95°C – 5 min
				[95 °C – 30 sec
				57 °C – 30 sec
				72 C – 2 min] x30
				72°C – 5 min
<i>T. delbrueckii</i>	A-Td-verif-1kb	TAGATGGTGTGCGTGAATG	A-Td-verif-1kb + C	95°C – 5 min
				[95 °C – 30 sec
				58 °C – 30 sec
				72 C – 3 min] x30
	B-Td-verif-1kb	GCTGGTACCCTTATTGTGG	B-Td-verif-1kb + D	72°C – 6 min
				95°C – 5 min
				[95 °C – 30 sec
				58 °C – 30 sec
				72 C – 3 min] x30
				72°C – 6 min
<i>S. bacillaris</i>	A-Sb-verif-1kb	CACAACTAACCCGTGGCA	A-Sb-verif-1kb + C	95°C – 5 min
				[95 °C – 30 sec
				58 °C – 30 sec
				72 C – 3 min] x30
	B-Sb-verif-1kb	TTGTGTTAGCCTGAAACCGC	B-Sb-verif-1kb + D	72°C – 6 min
				95°C – 5 min
				[95 °C – 30 sec
				58 °C – 30 sec
				72 C – 3 min] x30
				72°C – 6 min
<i>H. uvarum</i>	A-Hu-verif-1kb	ATGACACACCCTCATGT	A-Hu-verif-1kb + C	95°C – 5 min
				[95 °C – 30 sec
				58 °C – 30 sec
				72 C – 3 min] x30
	B-Hu-verif-1kb	TGCTCTCGTGACAGTCATTG	B-Hu-verif-1kb + D	72°C – 6 min
				95°C – 5 min
				[95 °C – 30 sec
				60 °C – 30 sec
				72 C – 3 min] x30
				72°C – 6 min

Chapitre 3 : Caractérisation fermentaire d'une communauté de six espèces de levures œnologiques

Supplementary Table 5: Details of the concentrations (A) and yields (B) of metabolites, as well as CO₂ kinetics parameters (C) at the end of fermentations of monocultures and consortium. C4: Consortium, Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Td: *Torulaspora delbrueckii*.

A

Species	End Time of Sampling	Glucose	Fructose	Ethanol	Glycerol	Lactic acid	Acetic acid	Pyruvic acid	Alphaketo acid
C4	176	0 ± 0 a	0.312 ± 0.0402 a	102 ± 0.283 a	6.25 ± 0.18 a	0.525 ± 0.00916 a	0.407 ± 0.0996 ab	0.0234 ± 0.00142 a	0.0396 ± 0.00176 ab
Hu	200	70.5 ± 2.5 b	65.4 ± 2.18 b	34.5 ± 1.02 b	3.98 ± 0.15 b	0.0249 ± 0.0192 b	0.922 ± 0.041 a	0.0781 ± 0.00349 b	0.0107 ± 0.0116 a
Lt	176	33.5 ± 1.08 c	46.5 ± 2.24 c	59.9 ± 1.63 c	5.78 ± 0.0421 ac	4.74 ± 0.398 c	0.645 ± 0.21 ab	0.0158 ± 0.00233 a	0.0427 ± 0.00442 ab
Mp	312	59.9 ± 0.996 d	77.5 ± 1.42 b	31.1 ± 0.474 b	4.68 ± 0.404 bc	0.0344 ± 0.0135 b	0.403 ± 0.411 ab	0.0649 ± 0.00701 b	0.195 ± 0.0359 c
Sb	312	98.8 ± 1.28 e	42.5 ± 10.9 c	31.8 ± 5 b	6.21 ± 1.1 a	0.0216 ± 0.0195 b	0.207 ± 0.145 b	0.375 ± 0.00853 c	0.103 ± 0.0258 d
Sc	144	0.00372 ± 0.00644 a	0.382 ± 0.106 a	103 ± 0.833 a	5.87 ± 0.0732 ac	0.402 ± 0.0131 a	0.346 ± 0.034 ab	0.0242 ± 0.000586 a	0.0674 ± 0.0111 bd
Td	312	1.5 ± 1 a	13.9 ± 4.27 d	94 ± 2.41 d	5.67 ± 0.033 ac	0.467 ± 0.0677 a	0.55 ± 0.216 ab	0.164 ± 0.0126 d	0.0244 ± 0.00398 ab

B

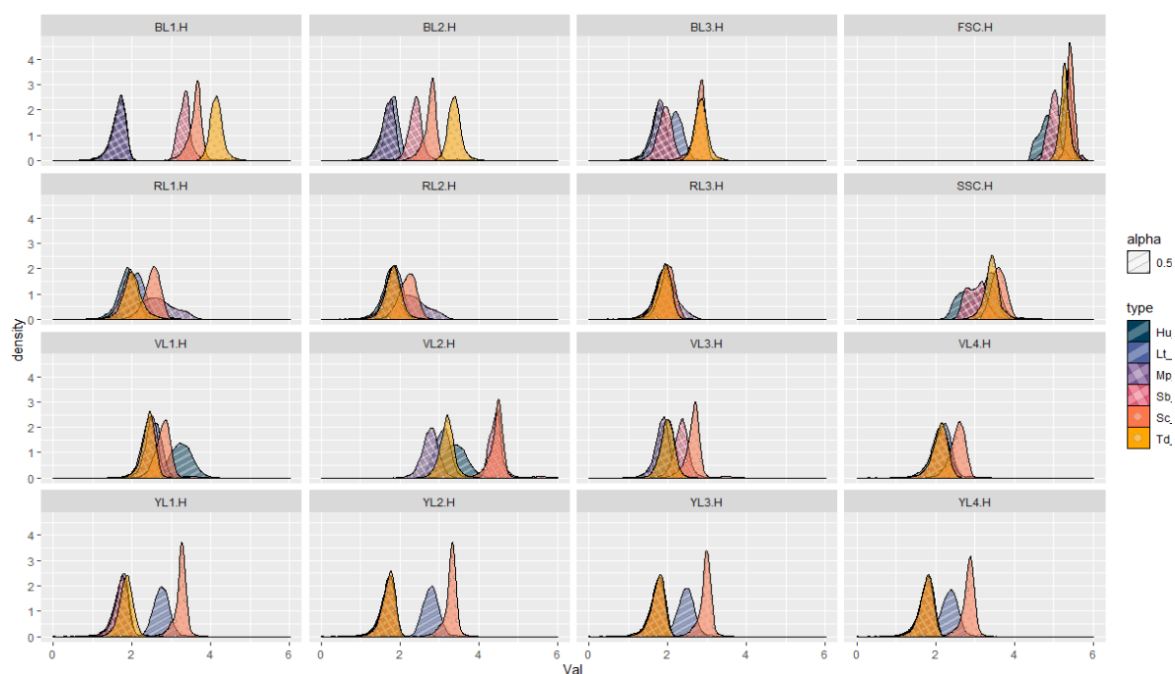
Species	End Time of Sampling	Yethanol	Yglycerol	Yacetic	Yalphaketo	Ylactic	Ypyruvic
C4	176	0.4995 ± 0.0014	0.03062 ± 0.000881 e	0.001994 ± 0.000488 b	0.0001941 ± 8.66e-06 c	0.00257 ± 4.53e-05 b	0.0001147 ± 6.96e-06 b
Hu	200	0.4725 ± 0.0494	0.05703 ± 0.00299 c	0.01326 ± 0.00176 a	0.0001626 ± 0.000187 c	0.0003413 ± 0.000259 b	0.001117 ± 5.65e-05 b
Lt	176	0.4667 ± 0.0201	0.04601 ± 0.00155 d	0.005163 ± 0.00188 ab	0.0003388 ± 2.13e-05 c	0.03774 ± 0.00471 a	0.0001249 ± 1.34e-05 b
Mp	312	0.4309 ± 0.0333	0.06823 ± 0.00387 b	0.005715 ± 0.00574 ab	0.00286 ± 0.000594 a	0.0004975 ± 0.000183 b	0.0009502 ± 0.000139 b
Sb	312	0.4714 ± 0.0433	0.09622 ± 0.00209 a	0.003599 ± 0.00325 b	0.00158 ± 0.000141 b	0.0003116 ± 0.000267 b	0.005962 ± 0.00127 a
Sc	144	0.4924 ± 0.00693	0.02855 ± 0.000498 e	0.001686 ± 0.000175 b	0.000328 ± 5.61e-05 c	0.001955 ± 6.01e-05 b	0.0001178 ± 3.38e-06 b
Td	312	0.4906 ± 0.012	0.02985 ± 0.00106 e	0.002917 ± 0.00122 b	0.0001284 ± 1.8e-05 c	0.002452 ± 0.000287 b	0.0008658 ± 9.52e-05 b

C

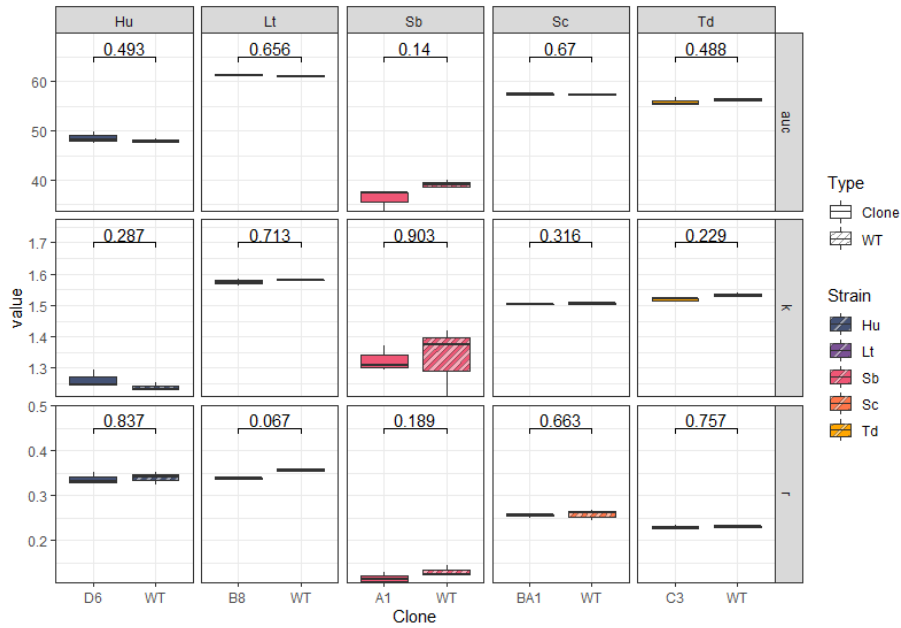
Species	End Time of Sampling	Latency	MaxCO2	Vmax	tF	tVmax
C4	176	25.34 ± 1.9 c	93.08 ± 1.06 a	1.736 ± 0.0591 b	158.5 ± 6.08 bc	38.68 ± 1.95 b
Hu	200	36.77 ± 6.49 b	28.58 ± 3.09 d	0.4278 ± 0.0543 d	196.7 ± 9.06 b	34.85 ± 6.54 bc
Lt	176	22.96 ± 1.74 c	55.45 ± 1.48 c	1.012 ± 0.0576 c	164.2 ± 10.4 bc	24.74 ± 1.29 c
Mp	312	36.16 ± 1.12 b	26.84 ± 0.474 d	0.2575 ± 0.0124 e	289.6 ± 25.9 a	26.74 ± 4.43 bc
Sb	312	57.52 ± 6.34 a	28.74 ± 3.84 d	0.248 ± 0.0303 e	306.8 ± 11.6 a	59.99 ± 8.18 a
Sc	144	18.65 ± 0.595 c	92.76 ± 0.544 a	2.162 ± 0.0171 a	120.6 ± 3.91 c	24.98 ± 1.25 bc
Td	312	25.12 ± 1.6 c	85.14 ± 3.22 b	1.105 ± 0.11 c	280.5 ± 54.6 a	32.01 ± 2.14 bc

Supplementary Table 6: Cell concentration (in log10) of the different species during fermentation of the consortium C4. Hu: Hanseniaspora uvarum, Lt: Lachancea thermotolerans, Mp: Metschnikowia pulcherrima, Sb: Starmerella bacillaris, Sc: Saccharomyces cerevisiae, Td: Torulaspora delbrueckii.

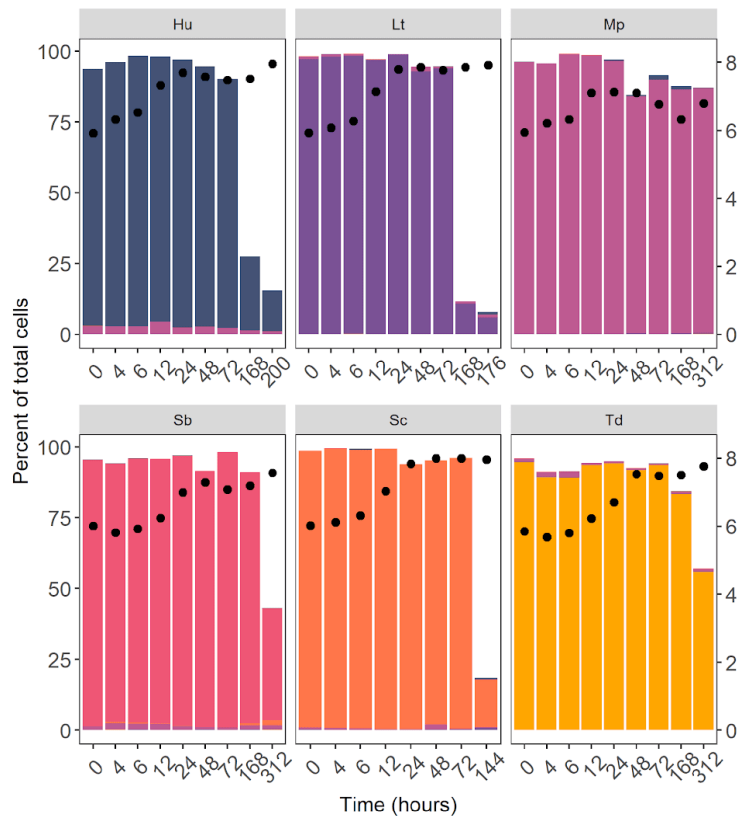
species	time	Hu	Sb	Sc	Mp	Lt	Td	Total	Live
Theoric inoculation	0	5,544068	5,30103	5	5,39794	4,69897	4,69897	6	6
C4	0	5.3 ± 0.073	5.2 ± 0.08	4.8 ± 0.068	5.3 ± 0.094	4.6 ± 0.082	4.6 ± 0.059	5.9 ± 0.076	5.9 ± 0.075
C4	4	5.8 ± 0.14	5.2 ± 0.026	5.1 ± 0.073	5.5 ± 0.075	4.8 ± 0.045	4.7 ± 0.075	6.2 ± 0.088	6.1 ± 0.088
C4	6	6.1 ± 0.029	5.3 ± 0.021	5.3 ± 0.056	5.7 ± 0.12	4.9 ± 0.022	4.9 ± 0.018	6.3 ± 0.04	6.3 ± 0.041
C4	12	6.7 ± 0.07	5.4 ± 0.053	6 ± 0.083	6 ± 0.09	5.6 ± 0.029	5.3 ± 0.05	6.9 ± 0.058	6.9 ± 0.059
C4	24	6.5 ± 0.31	5.5 ± 0.093	7 ± 0.092	5.9 ± 0.083	6.2 ± 0.07	5.7 ± 0.096	7.4 ± 0.068	7.2 ± 0.069
C4	48	6.1 ± 0.48	5.5 ± 0.087	7.6 ± 0.05	5.9 ± 0.062	6.3 ± 0.097	6.1 ± 0.035	7.8 ± 0.018	7.7 ± 0.032
C4	72	4.7 ± 0.3	4.4 ± 0.51	7.7 ± 0.058	5.2 ± 0.11	6.1 ± 0.15	5.9 ± 0.094	7.8 ± 0.022	7.7 ± 0.057
C4	168	4.8 ± 0.27	3.8 ± 0.34	7.5 ± 0.22	6.2 ± 0.18	6 ± 0.063	4.3 ± 0.23	8 ± 0.015	7.6 ± 0.19
C4	176	4.5 ± 0.11		7.1 ± 0.48	6.5 ± 0.14	5.9 ± 0.18	4 ± 0.3	8 ± 0.033	7.3 ± 0.38



Supplementary Figure 1: Fluorescence of the different transformants used in this study.



Supplementary Figure 2: Comparison of growth of wild type strains and transformants in MS425. *auc* = area under the curve (global parameter), *k* = maximum population, *r* = growth rate. Numeric values indicate *p*-value of a *t*-test between transformants and WT. *Hu*: *Hanseniaspora uvarum*, *Lt*: *Lachancea thermotolerans*, *Sb*: *Starmerella bacillaris*, *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*, *Td*: *Torulopsis delbrueckii*.



Supplementary Figure 3: Population growth in monocultures fermentation.

References

- Aphalo, P.J., 2023. ggpmisc: Miscellaneous Extensions to “ggplot2.”
- Bagheri, B., Bauer, F.F., Cardinali, G., Setati, M.E., 2020. Ecological interactions are a primary driver of population dynamics in wine yeast microbiota during fermentation. *Sci. Rep.* 10, 4911. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61690-z>
- Bagheri, B., Bauer, F.F., Setati, M.E., 2017. The Impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a Wine Yeast Consortium in Natural and Inoculated Fermentations. *Front. Microbiol.* 8, 1988. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01988>
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 243–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Bardi, L., Cocito, C., Marzona, M., 1999. *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 133–140. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00203-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00203-7)
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., Barre, P., 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in œnological conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 70, 246–252. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90057-4)
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., Fritsch, S., Röcker, J., Rauhut, D., 2015. Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* 241, 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2497-8>
- Binati, R.L., Lemos Junior, W.J.F., Luzzini, G., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., Torriani, S., 2020. 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.* 318, 108470. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108470>
- Blasche, S., Kim, Y., Oliveira, A.P., Patil, K.R., 2017. Model microbial communities for ecosystems biology. *Curr. Opin. Syst. Biol.* 6, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.09.002>
- Bordet, F., Joran, A., Klein, G., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., 2020. Yeast-Yeast Interactions: Mechanisms, Methodologies and Impact on Composition. *Microorganisms* 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040600>
- 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. *Nat. Methods* 5, 711–718. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1234>
- Chasseraud, L., Coulon, J., Marullo, P., Albertin, W., Bely, M., 2018. New œnological practice to promote non-*Saccharomyces* species of interest: saturating grape juice with carbon dioxide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3779–3791. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8861-4>
- Ciani, M., Comitini, F., 2015. Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Curr. Opin. Food Sci.* 1, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.07.001>
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 5547–5562. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10607-x>

- Cuijvers, K., van den Heuvel, S., Varela, C., Rullo, M., Solomon, M., Schmidt, S., Borneman, A., 2020. Alterations in Yeast Species Composition of Uninoculated Wine Ferments by the Addition of Sulphur Dioxide. *Fermentation* 6, 62. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020062>
- Deroite, A., Legras, J.-L., Rigou, P., Ortiz-Julien, A., Dequin, S., 2018. Lipids modulate acetic acid and thiol final concentrations in wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids. *AMB Express* 8, 130. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0657-5>
- Díaz, C., Molina, A.M., Nähring, J., Fischer, R., 2013. Characterization and dynamic behavior of wild yeast during spontaneous wine fermentation in steel tanks and amphorae. *BioMed Res. Int.* 2013, 540465. <https://doi.org/10.1155/2013/540465>
- Drumonde-Neves, J., Fernandes, T., Lima, T., Pais, C., Franco-Duarte, R., 2021. Learning from 80 years of studies: a comprehensive catalogue of non-*Saccharomyces* yeasts associated with viticulture and winemaking. *FEMS Yeast Res.* 21, foab017. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab017>
- Englezos, V., Cocolin, L., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Bloem, A., Dequin, S., Camarasa, C., 2018. Specific Phenotypic Traits of *Starmerella bacillaris* Related to Nitrogen Source Consumption and Central Carbon Metabolite Production during Wine Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 84. <https://doi.org/10.1128/AEM.00797-18>
- Englezos, V., Giacosa, S., Rantsiou, K., Rolle, L., Cocolin, L., 2017. *Starmerella bacillaris* in winemaking: opportunities and risks. *Curr. Opin. Food Sci.* 17, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.08.007>
- Esteve-Zarzoso, B., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 9.
- Fleet, G.H., 1993. *Wine Microbiology and Biotechnology*. CRC Press.
- Furukawa, S., Watanabe, T., Toyama, H., Morinaga, Y., 2013. Significance of microbial symbiotic coexistence in traditional fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 116, 533–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.017>
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Gordon, Z.B., Soltysiak, M.P.M., Leichthammer, C., Therrien, J.A., Meaney, R.S., Lauzon, C., Adams, M., Lee, D.K., Janakirama, P., Lachance, M.-A., Karas, B.J., 2019. Development of a Transformation Method for *Metschnikowia borealis* and other CUG-Serine Yeasts. *Genes* 10. <https://doi.org/10.3390/genes10020078>
- Grangeteau, C., Roullier-Gall, C., Rousseaux, S., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., 2017. Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microb. Biotechnol.* 10, 354–370. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12428>
- 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. *Microbiol. Read. Engl.* 147, 1383–1391. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-5-1383>
- 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 œnological conditions. *PLOS ONE* 15, e0233285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233285>
- Ivey, M., Massel, M., Phister, T.G., 2013. Microbial interactions in food fermentations. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 141–62. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101219>
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., 2006. Role and use of non-*Saccharomyces* in wine production. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 27, 15–39. <https://doi.org/10.21548/27-1-1475>
- Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., Spyropoulos, H., 2005. Growth and Fermentation Characteristics of a Strain of the Wine Yeast *Kluyveromyces thermotolerans* Isolated in Greece. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 1599–1602. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-8220-3>
- Kassambara, A., 2023. *rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests*.

- Kylilis, N., Tuza, Z.A., Stan, G.-B., Polizzi, K.M., 2018. Tools for engineering coordinated system behaviour in synthetic microbial consortia. *Nat. Commun.* 9, 2677. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05046-2>
- Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its importance to wine aroma-a review. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 97–129.
- Lee, S., Lim, W.A., Thorn, K.S., 2013. Improved blue, green, and red fluorescent protein tagging vectors for *S. cerevisiae*. *PLOS ONE* 8, 67902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067902>
- Lleixà, J., Manzano, M., Mas, A., Portillo, M.D.C., 2016. *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Competition during Microvinification under Different Sugar and Nitrogen Conditions. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01959>
- Loira, I., Morata, A., Bañuelos, M.A., Suárez-Lepe José, A., 2020. Isolation, Selection, and Identification Techniques for Non-*Saccharomyces* Yeasts of Oenological Interest, in: *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*. Elsevier, pp. 467–508. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816678-9.00015-1>
- Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., Alexandre, H., 2017. Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiol.* 62, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.023>
- Magyar, I., Nyitrai-Sárdy, D., Leskó, A., Pomázi, A., Kállay, M., 2014. Anaerobic organic acid metabolism of *Candida zemplinina* in comparison with *Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 178, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.002>
- Marcus, A., Raulet, D.H., 2013. A simple and effective method for differentiating GFP and YFP by flow cytometry using the violet laser. *Cytometry A* 83, 973–974. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22347>
- Mateus, D., Sousa, S., Coimbra, C., Rogerson, F., Simões, J., 2020. Identification and Characterization of Non-*Saccharomyces* Species Isolated from Port Wine Spontaneous Fermentations. *Foods Basel Switz.* 9. <https://doi.org/10.3390/foods9020120>
- Mbuyane, L.L., Bauer, F.F., Bloem, A., Camarasa, C., Ortiz-Julien, A., Divol, B., 2022. Species-Dependent Metabolic Response to Lipid Mixtures in Wine Yeasts. *Front. Microbiol.* 13, 823581. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.823581>
- Moenne, M.I., Saa, P., Laurie, V.F., Pérez-Correa, J.R., Agosin, E., 2014. Oxygen Incorporation and Dissolution During Industrial-Scale Red Wine Fermentations. *Food Bioprocess Technol.* 7, 2627–2636. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1257-2>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Colomo, B., Suárez, J.A., 2003. Pyruvic Acid and Acetaldehyde Production by Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae* : Relationship with Vitisin A and B Formation in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7402–7409. <https://doi.org/10.1021/jf0304167>
- Moreno-Beltrán, M., Gore-Lloyd, D., Chuck, C., Henk, D., 2021. Variation among *Metschnikowia pulcherrima* Isolates for Genetic Modification and Homologous Recombination. *Microorganisms* 9, 290. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020290>
- Niccum, B.A., Kastman, E.K., Kfoury, N., Robbat, A., Wolfe, B.E., 2020. Strain-Level Diversity Impacts Cheese Rind Microbiome Assembly and Function. *mSystems* 5, e00149-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00149-20>
- Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20, 331–341. <https://doi.org/10.1002/yea.965>
- Ocón, E., Gutiérrez, A.R., Garijo, P., Tenorio, C., López, I., López, R., Santamaría, P., 2010. Quantitative and qualitative analysis of non-*Saccharomyces* yeasts in spontaneous alcoholic fermentations. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 885–891. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1233-7>
- Peng, B., Williams, T.C., Henry, M., Nielsen, L.K., Vickers, C.E., 2015. Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift: a

- comparison of yeast promoter activities. *Microb. Cell Factories* 14, 91. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0278-5>
- Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J.-X., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, A., Barre, B., Freil, K., Llored, A., Cruaud, C., Labadie, K., Aury, J.-M., Istace, B., Lebrigand, K., Barbry, P., Engelen, S., Lemainque, A., Wincker, P., Liti, G., Schacherer, J., 2018. Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature* 556, 339–344. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0030-5>
- 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 Microbiol.* 83, 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.005>
- Piccardi, P., Vessman, B., Mitri, S., 2019. Toxicity drives facilitation between 4 bacterial species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 15979–15984. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906172116>
- Pourcelot, E., Conacher, C., Marlin, T., Bauer, F., Galeote, V., Nidelet, T., 2023. Comparing the hierarchy of inter-and intraspecies interactions with population dynamics of wine yeast cocultures. *FEMS Yeast Res.* foa039.
- Puig, S., Pérez-Ortín, J.E., 2000. Expression Levels and Patterns of Glycolytic Yeast Genes During Wine Fermentation. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 300–303. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80018-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80018-1)
- R Core Team, 2023. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Renault, P.E., Albertin, W., Bely, M., 2013. An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under œnological conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4105–4119. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4660-5>
- Rigottier-Gois, L., Le Bourhis, A.-G., Geneviève, G., Rochet, V., Doré, J., 2003. Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 237–245. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01063.x>
- Roudil, L., Russo, P., Berbegal, C., Albertin, W., Spano, G., Capozzi, V., 2020. Non-*Saccharomyces* Commercial Starter Cultures: Scientific Trends, Recent Patents and Innovation in the Wine Sector. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 11, 27–39. <https://doi.org/10.2174/2212798410666190131103713>
- Roy, K., Marzorati, M., van den Abbeele, P., van de Wiele, T., Boon, N., 2014. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. *Environ. Microbiol.* 16, 1472–81. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12343>
- Sablayrolles, J.M., 2009. Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Res. Int.* 42, 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.016>
- Seguinot, P., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., 2020. Impact of Nutrient Availability on the Fermentation and Production of Aroma Compounds Under Sequential Inoculation With *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 11, 305. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00305>
- Sheff, M.A., Thorn, K.S., 2004. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 661–670. <https://doi.org/10.1002/yea.1130>
- Simonin, S., Alexandre, H., Nikolantonaki, M., Coelho, C., Tourdot-Maréchal, R., 2018. Inoculation of *Torulaspora delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking. *Food Res. Int.* 107, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.034>
- Sternes, P.R., Lee, D., Kutyna, D.R., Borneman, A.R., 2017. A combined meta-barcoding and shotgun metagenomic analysis of spontaneous wine fermentation. *GigaScience* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix040>
- Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., Brandam, C., 2014. Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and

- nitrogen content. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1959–67. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1618-z>
- Tamang, J.P., Watanabe, K., Holzapfel, W.H., 2016. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Tourlousse, D.M., Narita, K., Miura, T., Sakamoto, M., Ohashi, A., Shiina, K., Matsuda, M., Miura, D., Shimamura, M., Ohyama, Y., Yamazoe, A., Uchino, Y., Kameyama, K., Arioka, S., Kataoka, J., Hisada, T., Fujii, K., Takahashi, S., Kuroiwa, M., Rokushima, M., Nishiyama, M., Tanaka, Y., Fuchikami, T., Aoki, H., Kira, S., Koyanagi, R., Naito, T., Nishiwaki, M., Kumagai, H., Konda, M., Kasahara, K., Ohkuma, M., Kawasaki, H., Sekiguchi, Y., Terauchi, J., 2021. Validation and standardization of DNA extraction and library construction methods for metagenomics-based human fecal microbiome measurements. *Microbiome* 9, 95. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01048-3>
- van de Velde, C.C., Joseph, C., Biclôt, A., Huys, G.R.B., Pinheiro, V.B., Bernaerts, K., Raes, J., Faust, K., 2022. Fast quantification of gut bacterial species in cocultures using flow cytometry and supervised classification. *ISME Commun.* 2. <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00123-6>
- Varela, C., Cuijvers, K., van den Heuvel, S., Rullo, M., Solomon, M., Borneman, A., Schmidt, S., 2021. Effect of Aeration on Yeast Community Structure and Volatile Composition in Uninoculated Chardonnay Wines. *Fermentation* 7, 97. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020097>
- Venturelli, O.S., Carr, A.C., Fisher, G., Hsu, R.H., Lau, R., Bowen, B.P., Hromada, S., Northen, T., Arkin, A.P., 2018. Deciphering microbial interactions in synthetic human gut microbiome communities. *Mol. Syst. Biol.* 14, 8157. <https://doi.org/10.15252/msb.20178157>
- Whiting, G.C., 1976. Organic Acid Metabolism of Yeasts During Fermentation of Alcoholic Beverages— a Review. *J. Inst. Brew.* 82, 84–92. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1976.tb03731.x>
- Wolfe, B.E., Button, J.E., Santarelli, M., Dutton, R.J., 2014. Cheese rind communities provide tractable systems for *in situ* and *in vitro* studies of microbial diversity. *Cell* 158, 422–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>
- Wolfe, B.E., Dutton, R.J., 2015. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. *Cell* 161, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.034>
- Zimmer, M., 2002. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chem. Rev.* 102, 759–782. <https://doi.org/10.1021/cr010142r>

Chapitre 4 :

**Comparaison de l'effet de la diversité
initiale des levures sur les propriétés
fermentaires en consortia lors de
fermentation en stress osmotique**

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

Dans ce dernier chapitre, nous avons souhaité utiliser notre écosystème pour étudier une théorie de l'écologie qui stipule qu'un écosystème est d'autant plus performant qu'il est diversifié. Nous avons donc cherché à déterminer l'impact de la diversité initiale d'un consortium de cinq espèces de levures de vin sur le processus de fermentation, en particulier lorsqu'il est soumis à un stress osmotique.

Nous avons travaillé sur le stress osmotique en lien avec les changements globaux. En effet à cause du réchauffement climatique, les raisins sont de plus en plus chargés en sucre ce qui a pour conséquence un stress osmotique de plus en plus fort en début de fermentation et un stress éthanol de plus en plus fort en fin de fermentation. En parallèle, des stratégies basées sur l'utilisation de non-*Saccharomyces* sont étudiées afin de réduire la teneur en éthanol des vins.

Pour cela nous avons généré aléatoirement 10 consortia composés des mêmes 5 espèces en proportions variables et avec un niveau de diversité α croissant. Pour ce chapitre, nous avons utilisé uniquement les espèces marquées d'une protéine fluorescente et donc exclu l'espèce *M. pulcherima*. Chacun des consortia a été suivi en fermentation œnologique avec 200 et 280 g/L de sucres initial. 280 g/L de sucre représentant un haut stress osmotique. Nous avons suivi au cours du temps la production des différents métabolites ainsi que la dynamique des sous-populations.

Nous avons ensuite initié une analyse de l'ensemble de ces données afin d'établir des liens entre résistance au stress, composition microbienne initiale et diversité α .

Does initial abundance of yeast matter in enological fermentation of a consortium under osmotic stress?

Authors: Eléonore Pourcelot¹, Audrey Vigna¹, Virginie Galeote¹, Thibault Nidelet¹

Affiliations: ¹SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

Abstract

Wine fermentation involves intricate assemblies of microorganisms, including yeast species beyond the commonly known *Saccharomyces cerevisiae*. While substantial research has deepened our comprehension of *S. cerevisiae*, the creation of multi-species fermentation starters has increased curiosity about yeast-yeast interactions and the significance of microbial variety in the wine production process. Model microbial communities, designed to mimic natural microbial diversity in simplified systems, offer opportunities to investigate population dynamics and grasp the importance of community diversity in ecosystem function. In this study, we used a five-yeast species microbial community to investigate a theory of ecology, which states that the more diverse an ecosystem is, the better it performs. We therefore sought to determine the impact of the initial alpha diversity on communities' performances subjected to osmotic stress. To this end, we randomly generated 10 consortia made up of the same five species in varying proportions and with different levels of alpha diversity. Each of the consortia was followed in enological fermentation with 200 and 280 g/L of initial sugars. We followed the production of the various metabolites and the dynamics of the subpopulations over time. Although we were unable to demonstrate a clear effect of the initial alpha diversity, we did show a strong effect of the initial proportion of certain species on population dynamics and metabolite production. For example, an increasing initial abundance of *H. uvarum* seemed to decrease yields in glycerol, lactic acid as well as the V_{max} for both sugar concentrations. The influence of *T. delbrueckii* seemed to change between both sugar conditions. Indeed, it tended to be slightly correlated with a higher acetic acid yield in condition 200 g/L, whereas it was associated with a reduced yield in acetic acid at 280 g/L. Overall, this study shed light on the importance of initial microbial composition on enological fermentation.

Introduction

Winemaking involves diverse microorganisms, present on grapes and in the winemaking environments. Since the late 19th century, selected strains of the species *Saccharomyces cerevisiae* are often added to the grape must to control the fermentation process (Kunkee 1984; Pretorius 2000). However, multispecies starters, using non-*Saccharomyces* species such as *Toruslaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* or *Lachancea thermotolerans* are now available on the market. These multispecies starters are used to increase aroma complexity or to prevent growth of spoilage microorganisms (Ciani *et al.* 2010; Roudil *et al.* 2020; Windholtz *et al.* 2023). This has led to an increasing number of studies on wine microbial ecology, ranging from investigation on the factors influencing yeast and bacterial diversity in grape must, such as climate and vine management (Bagheri *et al.*, 2018; Bokulich *et al.*, 2014; Grangeteau *et al.*, 2017), to the mechanisms of interactions involved between the different species (Bordet *et al.*, 2020). Studies on population dynamics have highlighted mechanisms of competition for nutrient, secretion of toxic compounds or involvement of cellular contact (Holm Hansen *et al.* 2001; Medina *et al.* 2012; Kemsawasd *et al.* 2015). Molecular mechanisms and phenotypic changes caused by interactions have also been studied through transcriptomic analysis or description of physical interactions of cell wall proteins (Brückner *et al.* 2020; Mencher *et al.* 2021 ; Conacher *et al.* 2022).

In addition, interactions and population dynamics of yeasts can be modulated by environmental conditions, such as the different stress factors they encounter during winemaking. Indeed, across the alcoholic fermentation yeasts are exposed to harsh conditions, encompassing low pH, low oxygen availability, or high sugar content (Heard et Fleet 1988; Bauer et Pretorius 2000; Varela *et al.* 2021). Some studies have focused on yeast diversity of specific high sugar fermentations, such as icewine or botrytised wine that contain around 350-400 g/L of sugars (Pigeau and Inglis 2005; Magyar and Soós 2016). These types of fermentation are associated with specific communities, particularly enriched in osmotolerant species such as *Starmerella bacillaris*, some *Zygosaccharomyces* spp., or *Candida lactis-condensi* (Nisiotou *et al.* 2007; Li *et al.* 2018; Csoma *et al.* 2020). However, few data are available on the behavior of yeast community during fermentation in otherwise high sugar contexts, such as observed due to climate change. Indeed, some world regions have seen the sugar content of grape must increase due to the maturation period being warmer, and the

phenolic maturity happening after reaching the optimal sugar content (Mira De Orduña 2010). Thus, solutions are sought to circumvent issues arising from high sugar concentrations since it can cause sluggish fermentations, higher ethanol content or wine defect due to the presence of residual sugars and lower acidity (Mira De Orduña, 2010).

Among other strategies, the use of selected strains of non-*Saccharomyces* to reduce ethanol content in mixed fermentation with *S. cerevisiae* has been considered as a possible solution (Quirós *et al.* 2014). However, to be efficient, such strategies need to be based on in-depth knowledge of yeast interactions at the community level. However, our current knowledge in this area is still lacking. In this work, we aim to fill this gap by focusing on determining how the initial diversity of a five species wine yeast consortium would affect the fermentation process, especially when submitted to an osmotic stress. Testing ten consortia inoculated with varying initial abundance, we tracked population dynamics of each species, and measured fermentation performance through CO₂ loss and production of carbon metabolites.

Materials and Methods

a. Strains

Five different yeast strains, originally isolated from must samples in Southern France and fluorescently tagged were used in this study: *H. uvarum* MTF5118 (*TDH3-BFP2 KANMX*), *L. thermotolerans* MTF4901 (*TDH3-mCherry NATMX*), *S. cerevisiae* MTF5119 (*TDH3-mCherry KANMX ENO2-GFP NATMX*), *S. bacillaris* MTF4909 (*TDH3-eGFP HYGMX*), and *T. delbrueckii* MTF5120 (*TDH3-mCitrine NATMX*). Details on the construction of the strains are available in Pourcelot *et al.* 2024 (in prep). Strains were kept at -80°C in yeast peptone dextrose YPD (1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% glucose) supplemented with 20% of glycerol before being streaked on YPD agar and incubated at 28°C for 2 days.

b. Experimental fermentation

Fermentations were carried out in 300 mL fermenters containing 250mL of synthetic grape must (SGM425) prepared as described by Bely *et al.* (1990). The available nitrogen was 425 mg/L (as a mix of ammonium and amino acids) and the final concentration of sugars was either 200 or 280 g/L (denominated S200 or S280, respectively) with an equimolar

combination of glucose and fructose. Must was pasteurized at 100°C for 15 min and then aerated by bubbling with air for 20 min. Before inoculation, must was supplemented with 5 mg/L of phytosterols (Beta-sitosterol, Sigma, St-Louis, US, MO - ref 85451-100g - Batch BCBX9222). Fermentation kinetics was followed by manual weighing at least twice a day. Fermentations were considered finished when CO₂ total production reached 93 g/L for S200 condition and 129 g/L for S280, or when no weight variation was observed for two consecutive days (CO₂ production rate < 0.05 g/L/h).

Cell cultures were prepared with a first propagation in 5 mL YPD for 18 hours at 28°C, and a second propagation of 1 mL in 50 mL of SGM425 for 24 hours at 28°C with agitation. Cell concentration in culture was measured by cytometry before inoculation. Appropriate cell volume of each species cultures were mixed for the different consortia, so that total cell number in fermenters was 10⁶ cells/mL. Cell mixes were centrifuged at 4415 g for 5 min and washed in physiological water (9 g/L of sodium chloride, Sigma), and suspended in 5 mL of MS425 (S200 or S280) for inoculation. Fermentations were run at 24°C with 280 rpm agitation, and in three biological replicates.

Eleven consortia with all five species were tested (noted C02 to C12), with varying initial relative abundance of the different species (except for *S. cerevisiae* which had an initial abundance of 5% in C02 to C11, and 15 % in C12) encompassing different levels of diversity (Table 1). Shannon index was calculated with the formula: $-\sum^n p_i \ln(p_i)$ where p_i is the relative abundance of species i , and n the number of species. C12 is adapted from a consortium previously tested in our team (Pourcelot et al 2024, in prep). Two consortia consisting of equal initial abundance for all species, with *S. cerevisiae* (C07) or without (C13), as well as a control with *S. cerevisiae* alone (noted C01) were also included.

c. Population dynamics and metabolite analysis

Just after inoculation and at the end of fermentation, 5 mL of fermenting must were sampled aseptically to number cells with flow cytometry, and measure extracellular metabolites and sugar concentrations by high-performance liquid chromatography (HPLC). Additionally, cells were numbered at 24, 48, 72, 120, 168 hours after aseptically sampling 2 mL of fermenting must.

Table 1: Composition (in %) and diversity index of the different consortia tested in this study. Sc: *S. cerevisiae*, Hu: *H. uvarum*, Sb: *S. bacillaris*, Lt: *L. thermotolerans*, Td: *T. delbrueckii*.

Consortium	Sc	Hu	Sb	Lt	Td	Shannon index
C01	100,00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.000
C02	5,00	75.00	5.00	10.00	5.00	0.895
C03	5,00	5.00	15.00	5.00	70.00	0.983
C04	5,00	25.00	60.00	5.00	5.00	1.102
C05	5,00	5.00	50.00	35.00	5.00	1.163
C06	5,00	30.00	5.00	10.00	50.00	1.237
C07	5,00	23.75	23.75	23.75	23.75	1.515
C08	5,00	25.00	50.00	15.00	5.00	1.277
C09	5,00	5.00	45.00	20.00	25.00	1.327
C10	5,00	45.00	25.00	10.00	15.00	1.370
C11	5,00	25.00	30.00	30.00	10.00	1.449
C12	15,00	40.00	25.00	10.00	10.00	1.458
C13	0,00	25.00	25.00	25.00	25.00	1.386

Population cell number was monitored by flow cytometry with the Attune NxT Thermofisher Flow Cytometer (Life Technologies, Singapore) equipped with an AttuneNXT Autosampler. Briefly, cells were washed in PBS (130 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, pH 7.4; Sigma) and diluted to obtain cell concentrations about 5.10⁵ to 1.10⁶ cells/mL. Cells suspended in PBS were kept at room temperature for 2 hours to restore fluorescence, which is likely lost due to the low oxygen content during fermentation. This step did not impair total cell count or viability (data not shown). Then, the different species tagged with one or two fluorescent proteins were detected with a specific set of channels described in **Table 2**. Viability was assessed after staining cells with 1 µg/mL propidium iodide (PI, stored at 4°C protected from light; Calbiochem), viability measures were done technical duplicates. Each population. Gating was done with the AttuneNxT software.

Extracellular metabolites and sugar concentrations (glucose, fructose, ethanol, glycerol, acetic acid, lactic acid, pyruvic acid, and α-ketoglutaric acid) were determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) as described in Deroite et al. (2018). Samples were taken at the start and at the end of fermentation, then centrifuged 5 min at 4415 g at 4°C to get rid of cells. Supernatant aliquots were kept at -18°C before being diluted with 2.5 mM sulfuric acid (H₂SO₄, Merck, Darmstadt, Germany) at 1:6, and centrifuged again at 16000

g at 4 °C for 5 min. Supernatants of diluted samples were kept at -18°C until analysis. HPLC were run on the HPLC 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a Phenomenex Rezex ROA ion exclusion column (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) set at 60°C. It was resolved isocratically with 2.5 mM H₂SO₄ at a flow rate of 0.6 mL/min. Concentrations of acetic, lactic and α-ketoglutaric acids were measured with a UVmeter at 210 nm and other compounds with a refractive index detector. All samples were analyzed with technical duplicates and data analysis were performed on the mean.

Table 2: Description of the set of channels (with description of filters) used for the detection of the different populations considered in this study.

Population	Fluorochrome	Channel	Voltage	Fluorescence
Dead cells	PI	BL3 (488 – 695-40)	340	+
Live cells	PI	BL3 (488 – 695-40)	340	-
<i>S. cerevisiae</i>	mCherry + GFP	YL2 (600DLP-620/15)	320	+
		BL1 (495DLP-530/30)	260	+
<i>L. thermotolerans</i>	mCherry	YL2 (600DLP-620/15)	320	+
		BL1 (495DLP-530/30)	260	-
<i>S. bacillaris</i>	mCitrine	BL1 (495DLP-530/30)	260	+
		VL2 (495DLP-512/25)	400	-
<i>T. delbrueckii</i>	EGFP	BL1 (495DLP-530/30)	260	+
		VL2 (495DLP-512/25)	400	-
<i>H. uvarum</i>	mTagBFP2	YL2 (600DLP-620/15)	320	-
		BL1 (495DLP-530/30)	260	-
		VL1 (417LP-440/50)	340	+

d. Data analysis

Yield of metabolite at the end of fermentation were calculated following the formula:

$$Y_{\text{metabolite}} = \frac{\text{Final metabolite concentration (g/L)}}{\text{Initial sugar concentration (g/L)} - \text{Final sugar concentration (g/L)}} \quad (1)$$

In addition, differences in yields between the S200 and S280 conditions were visualized by calculating the difference between both conditions with the following formula:

$$\Delta_{S280,S200} = \frac{Y_{S280} - Y_{S200}}{Y_{S200}} \quad (2)$$

Comparison between both sugar conditions were done with t-test for consortia C01 to C13, on the following parameters: proportions of the different subpopulation at 24h, 48h and 120h (after transformation of the data with an arcsin function), residual sugars, yield in CO₂, and end yields in ethanol, glycerol, and acetic, lactic, α-ketoglutaric and pyruvic acids.

Consortia were compared by distinct ANOVA for S200 and S280 conditions for CO₂ and metabolic parameters. All statistical analyses were run with the R software (R Core Team, 2023) with the package *rstatix* (Kassambara, 2023).

Results and Discussion

a. Effect of osmotic stress on fermentation performance

In this study, we aimed to test how microbial diversity of a yeast consortium would modulate its response to an osmotic stress. For that, we followed enological fermentations of 13 consortia with different levels of diversity in two synthetic musts with 200 or 280 g/L of sugar. These two concentrations were chosen to simulate a common concentration of sugar found in musts (200 g/L), and a high sugar concentration (280 g/L, Ferreira *et al.* 2006; Schmidt *et al.* 2020). Such sugar concentrations have already been found in different world regions in recent years (Bock *et al.* 2013; Gambetta and Kurtural 2021).

Fermentation kinetics showed some difference between both sugar conditions (

Figure 1, Supplementary Table 1). At S200, all consortia that included *S. cerevisiae* and *S. cerevisiae* monoculture (C01) finished fermentation before 120 h, with *S. cerevisiae* monoculture being a little quicker. At S280, they stopped fermentation after about 290 h, without reaching the theoretical maximum CO₂ production, which is higher due to the higher initial sugar content. In both sugar conditions, the consortium without *S. cerevisiae* stopped fermenting at respectively 67.5 ± 3.2 and 64.6 ± 1.52 after 290 hours.

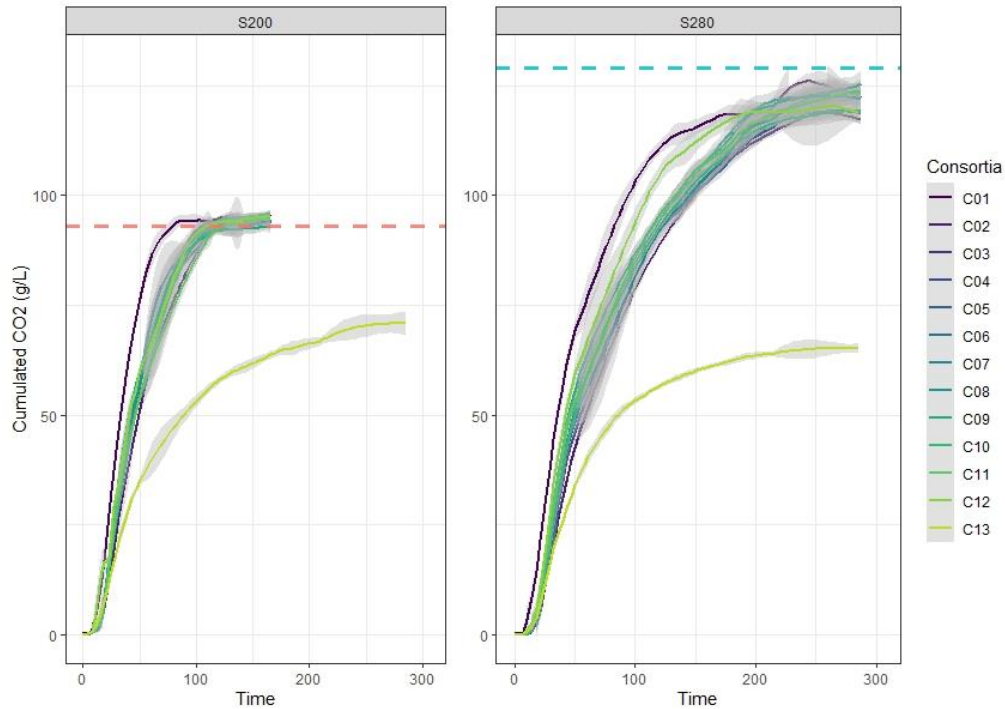


Figure 1: CO₂ production kinetics for both sugar conditions (S200 and S280). Dashed lines indicate the theoretical maximum CO₂ production according to the initial sugar concentration, considering a yield of 0.47 g CO₂/g sugar.

These observations were confirmed with the content in residual reducing sugars in consortia at the end of fermentation, as shown in **Figure 2A**. Higher initial sugar concentration caused *S. cerevisiae* monoculture (C01) and consortia C02 to C12 to leave residual sugars, between 18.0 ± 5.9 in consortium C09 and 37.4 ± 6.4 g/L in consortium C04, while no residual sugars were left with 200 g/L of sugars (Figure 2A). Only consortium C13, which did not include *S. cerevisiae*, showed significantly higher residual sugar concentrations (Supplementary Table 1). This consortium left 55.6 ± 5.5 g/L and 138 ± 7.9 g/L, in conditions S200 and S280 respectively (Figure 2A). However, as depicted on Figure 2B, which shows the yield in CO₂, fermentation efficiency was not impacted by the high sugar concentration since CO₂ yields were the same in both sugar conditions. It should be noted that all fermentations were considered stopped once weight loss did not change for two consecutive days, so the residual sugars resulted from stuck fermentations. When plotting the percent of live cells against the fermentation progress (Figure 3), cell viability was between 23 and 50 % for the consortia in condition S200 at the end of fermentation, while for S280 less than 10 % of cells were left alive. Thus, in condition S280, viability dropped before reaching the theoretical maximal CO₂ production. Thus, these stuck fermentations are likely due to the population dying off quickly before the sugar consumption was complete (Bisson 1999). Moreover, in all consortia but

C01, viability followed similar trends in both sugar conditions until 100 g/L of released CO₂, which is directly correlated to the ethanol production. This first decrease was mostly related to the death of non-*Saccharomyces* cells (Supplementary Figure 1), which are often less tolerant to ethanol, especially at higher temperature (Fleet, 2003; Jolly et al., 2006). After the release of 100 g/L of CO₂, the number of viable cells in condition S280 comprised mainly live *S. cerevisiae* (Supplementary Figure 1). This number stabilized before declining sharply below the theoretical maximum CO₂ release (129 g/L; Figure 3). This second event of cell death may be caused by an ethanol stress greater in the S280 conditions resulting from a greater conversion of sugar to ethanol (Bauer and Pretorius, 2000).



Figure 2: Concentration of residual reducing sugars (A) and yields in CO₂ (B) after the fermentation stopped in the consortia and monocultures C01 to C13 for initial sugar concentrations of 200 and 280 g/L. C01 is a monoculture of *S. cerevisiae*. C02 to C11 initially contained 5% of *S. cerevisiae*. C12 initially contained 15% of *S. cerevisiae* and C13 did not contain *S. cerevisiae*.

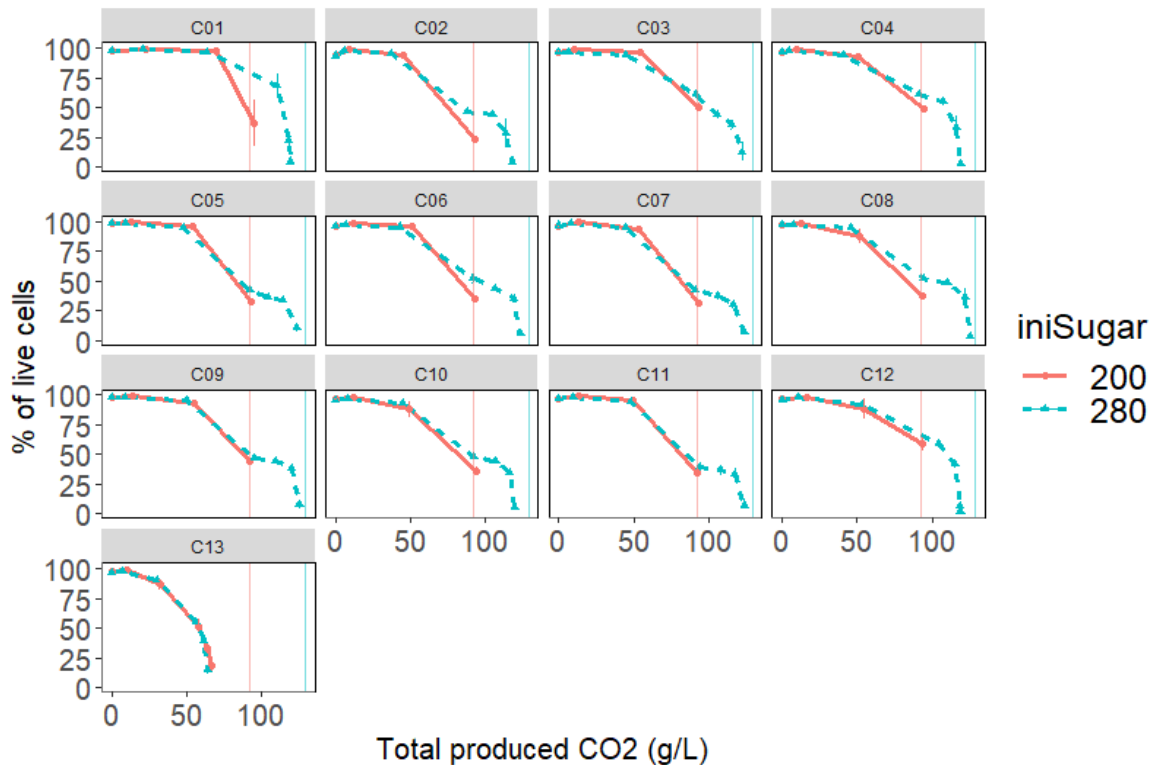


Figure 3: Percent of live cells along the fermentation. Vertical lines indicate the theoretical maximum CO₂ that can be produced from the initial sugar concentration. C01 is a monoculture of *S. cerevisiae*. C02 to C11 initially contained 5% of *S. cerevisiae*. C12 initially contained 15% of *S. cerevisiae* and C13 did not contain *S. cerevisiae*.

b. Effect of osmotic stress on population dynamics

When looking at the population dynamics, results seem to indicate *S. cerevisiae* in monocultures was not much affected by the different sugar conditions and had reached its maximum population of 8.12 log at 21 hours (Supplementary Table 2Supplementary Table 3). In consortia, *S. cerevisiae* largely dominated all consortia after 120 hours in both sugar conditions and constituted the only live cells, except in consortium C03 (Figure 4, Supplementary Table 2Supplementary Table 3). Unlike the others, in the latter consortium there was 17% remaining of *T. delbrueckii* at 120h in condition S280, which led to a delayed dominance of *S. cerevisiae* that reached over 95% of total cells only after 168 hours instead of 120 hours in the S200 condition.

Observations revealed variations in the dynamics of non-*Saccharomyces* populations depending on the initial sugar concentration (Figure 4, Supplementary Figure 2). Among these trends, significant differences in population abundance between S200 and S280 were found at 45 hours. These differences are shown with a matrix in Supplementary Figure 3. In most consortia, *H. uvarum* reached a similar maximum proportion at 21 h for both sugar conditions

but decreased more quickly in condition S280 (Figure 4). After 45h, while the CO₂ production was the same between S200 and S280 conditions, the negative difference in abundance of *H. uvarum* between S200 and S280 often corresponded to the increase of *S. cerevisiae*, both for the abundance and population data (Supplementary Figure 3A, Supplementary Table 2, Supplementary Table 3). For example, in consortia C02 and C04, the abundance of *S. cerevisiae* was respectively 25 and 10 % higher with S280 than S200, whereas *H. uvarum* was 26 and 10 % lower. Similarly, *L. thermotolerans* tended to decrease more quickly in condition S280, except in consortium C13 (without *S. cerevisiae*), while *T. delbrueckii* tended to maintain a higher proportion in condition S280 as compared to S200 (Figure 4). At 45 hours in consortium C03, the decrease in abundance between S200 and S280 of *L. thermotolerans* partially matched the increase in abundance of *T. delbrueckii* (6% less *L. thermotolerans* and 15% more *T. delbrueckii* in condition S280). This consortium also showed a longer persistence of *T. delbrueckii* with S280 compared to the other consortia. In consortium C04, the decrease of 10% in the abundance of *L. thermotolerans* was mainly in favor of *S. cerevisiae* (Supplementary Figure 3). Regarding *S. bacillaris*, it decreased very quickly and its proportion was less than 5% after 21h in all consortia, for both sugar concentrations.

Taken together, these results indicate a tendency of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* to be promoted in a complex community during a fermentation under an initial osmotic stress, while *H. uvarum* and *L. thermotolerans* were negatively impacted. *T. delbrueckii* is described as relatively osmotolerant, to both salts and reducing sugars (Lages *et al.* 1999 ; Hernandez-Lopez *et al.* 2003), and has been found able to maintain a high population in a natural must with 250 to 360 g/L of sugars (Bely *et al.* 2008 ; Belda *et al.* 2015). Thus, the fact that it tended to be promoted at S280 in our study was to be expected. On the other hand, we found that *S. bacillaris* abundance decreased very quickly even in the S280 condition. This is somewhat surprising given this species is osmotolerant and could be expected to be promoted in high sugar must (Tofalo *et al.* 2012 ; Csoma *et al.* 2020). Its osmotolerant nature means it is often isolated in fermentations of high sugar must, such as icewine or botrytised wine that can usually contain at least 350 g/L of reducing sugar (Magyar and Soós, 2016). It can even dominate early and middle stages of such fermentations (Magyar and Soós, 2016; Nisiotou *et al.*, 2007). Our inconsistent results might be due to the use of synthetic must with high nitrogen content that could limit the establishment of *S. bacillaris* in a community, in favor of faster growing species. Fewer data are available for *H. uvarum* or *L. thermotolerans* in

conditions of high-sugar fermentation. In botrytised must, *H. uvarum* was shown to decrease more quickly than in healthy must, but other factors than the initial osmotic stress, such as presence of other species, may also explain these results since this observation stayed true even when there was no difference in initial sugar (Nisiotou *et al.* 2007 ; Contreras *et al.* 2015). Another interesting highlight from these data are the differences of population dynamics in the different consortia, which shows that initial abundance of the different species can influence their growth under different conditions. This could be explained by differences in response of the different species to the osmotic stress in the first hours, since different coping mechanisms seem to occur in *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* for example (Renault *et al.* 2009; Tondini *et al.* 2020).

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

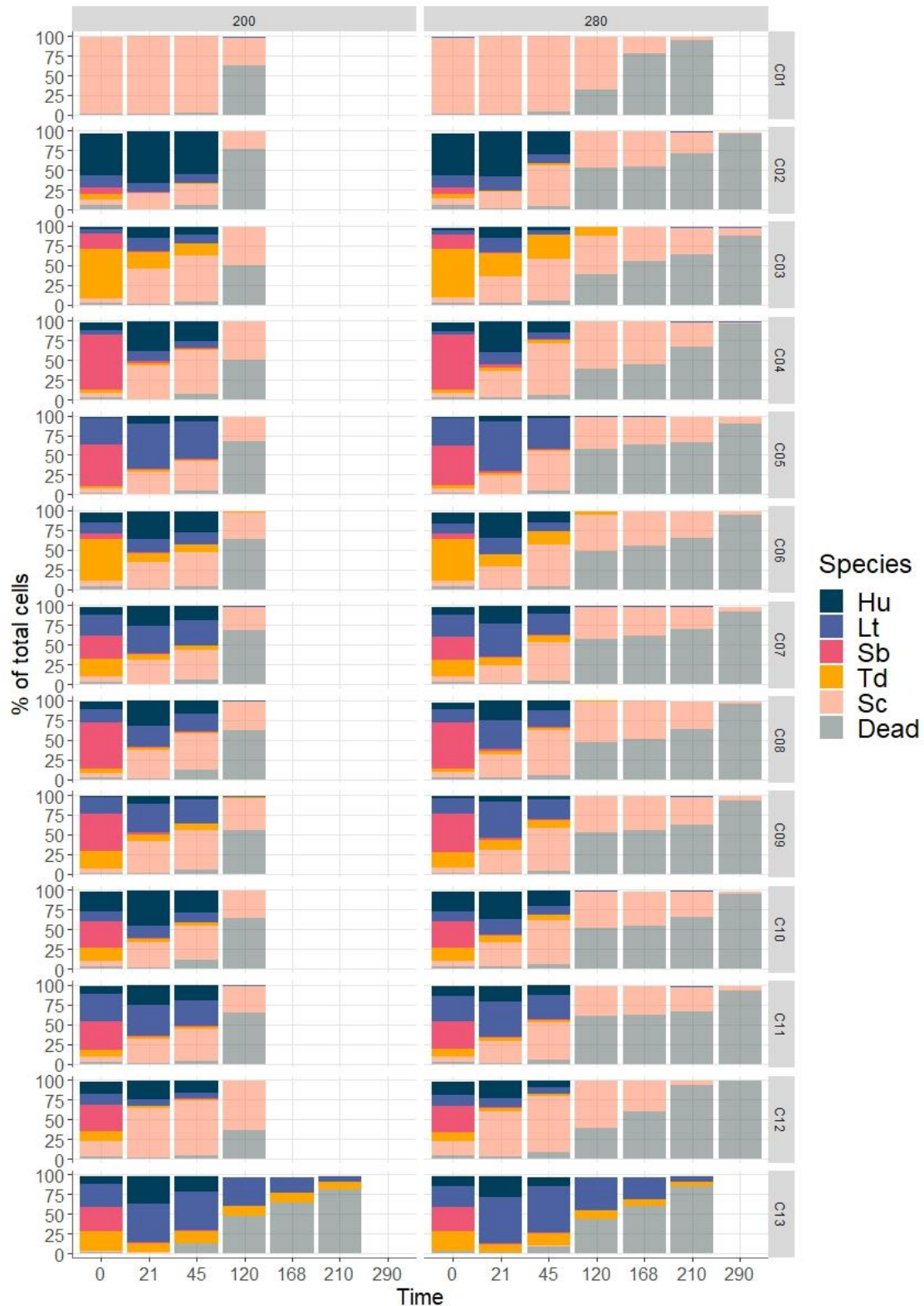


Figure 4: Population dynamics in consortia during fermentation with 200 and 280 g/L of sugars. C01 is a monoculture of *S. cerevisiae*. C02 to C11 initially contained 5% of *S. cerevisiae*. C12 initially contained 15% of *S. cerevisiae* and C13 did not contain *S. cerevisiae*. Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Td: *Torulaspora delbrueckii*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*.

c. Differences in metabolite production balance

The difference in yield of the main metabolite from carbon metabolism between S280 and S200 is shown for *S. cerevisiae* monocultures in Figure 5. Positive values indicate higher yield in condition S280, while negative values indicate lower yield in condition S280. Higher initial sugar concentrations led *S. cerevisiae* to produce more acetic acid (increase by 75 % of yield in acetic acid) coupled to a lower production in α -ketoglutaric acid (decrease by 60 % of yield in α -ketoglutaric acid, **Figure 5**). Osmotic stress induced by salts (Modig *et al.* 2007 ; Kutyna *et al.* 2010) and high initial sugar concentration (Ferreira *et al.*, 2006; Pigeau and Inglis, 2005) are known to trigger overproduction of acetic acid in *S. cerevisiae*. Despite few data being available on α -ketoglutaric acid during osmotic stress, it seems to be negatively correlated with acetic acid production in *S. cerevisiae* (Nidelet *et al.* 2016). In addition, we also observed a lower yield in ethanol and lactic acid for *S. cerevisiae* monoculture with high initial sugars, although very small for ethanol (decrease of 1.6 % for the ethanol yield and 25% for the lactic acid yield). In some cases, lower ethanol yield has been reported for high initial sugar conditions with *S. cerevisiae*, which was related to a deviation of the metabolic flux toward the overproduction of glycerol (Pigeau and Inglis 2005; Oláhné Horváth *et al.* 2020). Moreover, a constitutive overexpression of the *GPD1* gene, which is also transiently overexpressed in response to osmotic stress, leads to decrease in ethanol production, coupled to an increase in acetate and glycerol production (Remize *et al.* 1999; Hohmann 2009). Surprisingly, even though glycerol is an essential osmolyte involved in osmotic stress resistance (Hohmann, 2009; Modig *et al.*, 2007), our results did not show significant differences in glycerol yields ($Y_{S200} = 0.032 \pm 0.001$, $Y_{S280} = 0.034 \pm 0.001$). One possible explanation for this observation may be that the sugar difference between both conditions was not enough to cause noticeable change in glycerol yield. We did not observe differences for yield of pyruvic acid for both initial sugar conditions in the *S. cerevisiae* monoculture.

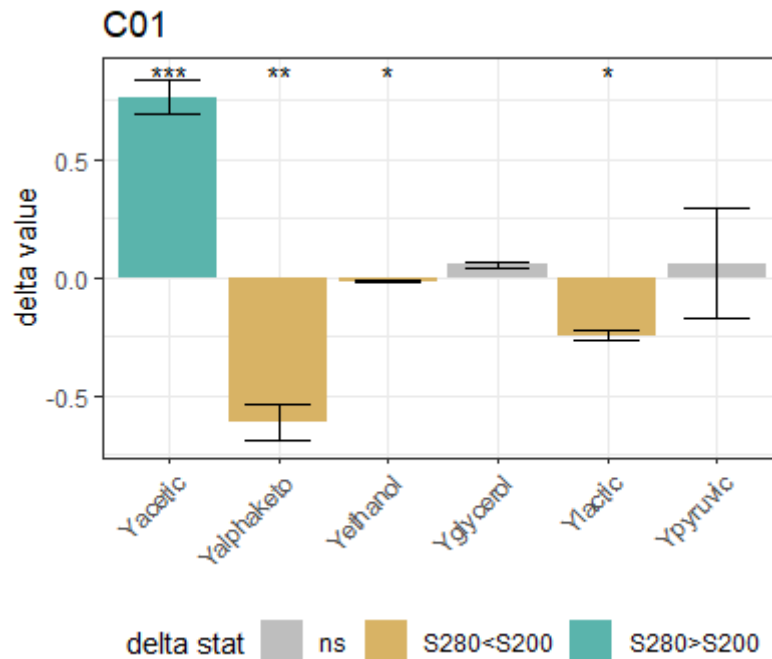


Figure 5: Relative change between the S200 and S280 conditions in metabolite yield. Both sugar conditions were compared by T-test. Results are indicated on top. Gray bars: p-value > 0.05; *, **, ***: p-value inferior to 0.05, 0.01, 0.0001 respectively (in blue when the difference is positive, red when the difference is negative).

We next set out to compare the response to osmotic stress in the consortia. The differences in metabolite yield between the two sugar conditions are shown in Figure 6. The different consortia exhibited a wide range of responses, especially regarding the production of acetic and pyruvic acids. Contrary to *S. cerevisiae* monoculture, consortia tended to have lower pyruvic acid yield in condition S280, but differences were significant only in consortia C07, C11 and C13. However, as this metabolite is produced then consumed during fermentation (Whiting 1976; Morata *et al.* 2003), differences might arise even with only small differences in sampling time. Thus, endpoint measures of pyruvic acid are more prone to high variability and harder to interpret. Regarding acetic acid, its overproduction in condition S280 was greatly reduced in all consortia compared to *S. cerevisiae* monoculture since the highest increase was of 31 % in consortium C02. In the consortium inoculated with a higher proportion of *S. cerevisiae* (C12), 55 % more acetic acid was produced in condition S280 than at S200. In addition, differences in yield of acetic acid in consortia were only significant for consortia C02, C11 and C12. This may be partly due to the presence of non-*Saccharomyces* since several studies report a positive effect of mixed fermentation of *S. cerevisiae* with non-*Saccharomyces*, namely *S. bacillaris* and *M. pulcherrima*, in reducing the acetate yield

(Rantsiou *et al.* 2012; González-Royo *et al.* 2015). This reduction has also been demonstrated both in natural and synthetic must with high sugar content, for mixed fermentation associating one to 4 non-*Saccharomyces* species (Bely *et al.* 2008; Rantsiou *et al.* 2012; Contreras *et al.* 2015; Mbuyane *et al.* 2018). Yet, this reduction has been mainly observed in sequential inoculation rather than co-inoculation and can be strain-dependent. In our data, acetate yield of consortia in condition S200 were not different from *S. cerevisiae* monoculture. It was only in condition S280 that the yields were lower, which would exclude a single NS presence effect (Supplementary Table 4B). Another hypothesis might then lie in the population changes between both sugar conditions. With S280, *H. uvarum* decreased more quickly while *T. delbrueckii* stayed longer. *T. delbrueckii* is known to produce low amount of acetic acid (Bely *et al.*, 2008; Renault *et al.*, 2009), while *H. uvarum* is associated with high production in acetic acid (Ciani and Maccarelli 1998 ; Capece *et al.* 2005 ; Mendoza *et al.* 2019) their difference in dynamics may therefore influence the overall response.

On the contrary, the yield in α -ketoglutaric acid remained lower in condition S280 compared to S200. Differences ranged from 53% lower to 68% lower in consortia C11 and C03 respectively. Only in consortium C02 was it not significantly different between both sugar conditions. This could suggest a prevailing importance of *S. cerevisiae* concerning this metabolite since the difference between both S280 and S200 was often close to that observed in *S. cerevisiae* monocultures, as indicated by the orange diamonds (Figure 6). Regarding ethanol, consortia showed an overall lower yield with S200 compared to *S. cerevisiae* monocultures (between 0.482 ± 0.001 in C05 and 0.494 ± 0.003 in C10) that could be linked to the presence of non-*Saccharomyces*, which are known to have lower ethanol yield (Gobbi *et al.* 2013 ; Contreras *et al.* 2015 ; Ciani *et al.* 2016b ; Harlé *et al.* 2020).

d. *Effect of initial composition on consortia behavior.*

Consortia C02 to C11 were designed to represent variable α diversity, through increasing evenness of the initial relative abundance of non-*Saccharomyces* species (Table 1). Hence, the Shannon index of the different consortia varied from 0.895 in C02 to 1.449 in C11, except C07 that presents an equal proportion of each NS species, and a 1,515 Shannon index. These 10 consortia also included the same initial abundance of 5% of *S. cerevisiae*, to avoid changes being related only to *S. cerevisiae*. We were interested in knowing whether an increasing diversity in the yeast consortia would help maintain the fermentation performance

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

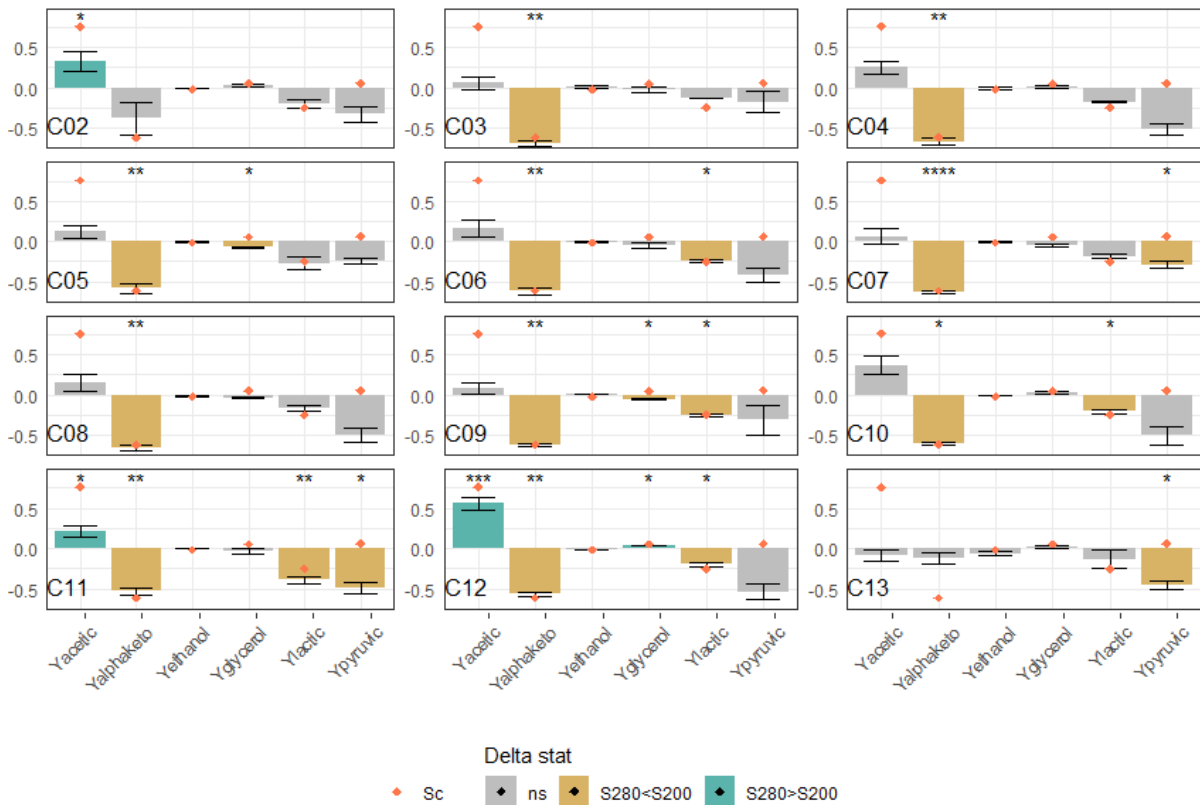


Figure 6: Metabolite yield changes in the different consortia (calculated by dividing the difference between measures for S280 and S200 by the measure for S200). Both sugar conditions were compared by T-test. Results are indicated on top. Gray bars: p -value > 0.05 ; *, **, ***: p -value inferior to 0.05, 0.01, 0.0001 respectively (in blue when delta is positive, red when delta is negative). Orange diamonds indicate the values observed in C01 (*S. cerevisiae* monoculture). C02 to C11 initially contained 5% of *S. cerevisiae*. C12 initially contained 15% of *S. cerevisiae* and C13 did not contain *S. cerevisiae*.

during the osmotic stress. However, we found no demonstrable effect of the initial diversity on the different parameters related to fermentation performance, such as yield in CO₂, yield in metabolites or residual sugars (Supplementary Figure 4). This absence of effect with the current setup might be related to several factors. First, the ecology theory that stipulates a positive correlation between diversity and functioning is based on the complexity of the environment, generating a set of ecological sub-niches that are all the more covered as microbial diversity increases (Hooper et al., 2005; Shade et al., 2012). Under our experimental setup, the relatively low complexity of our environment may not be sufficient to generate these effects. For example, Schmidt *et al.* (2020) observed differences in *S. cerevisiae* strains dynamics in natural must with 200 or 280 g/L of sugars, but no difference in synthetic must. In addition, the range of diversity tested in this study might be limited since it varied only based on initial abundance and the number of species (and therefore species richness) was constant. For example, Ruiz *et al.* (2023) showed a negative effect of increasing diversity in

wine yeast communities, by increasing the species richness. They observed that *S. cerevisiae* could not finish fermentation in some communities due to the higher probability of the presence of antagonistic species. Diversity effect has also been observed in microcosms, where fermentation performance was reduced in the highest and lowest diversity context, due to a lower establishment of *S. cerevisiae* (Boynton and Greig 2016). But our understanding on the validity of the diversity-function hypothesis remains hindered by the still small number of studies testing this hypothesis on yeast communities specifically (Bruns 2019).

Even though no effect of the initial diversity could be observed in this study, the initial composition still influenced the behavior of the consortia at both sugar concentrations (Figure 6). Thus, we tested the correlation between the different fermentation parameters and the initial abundance of the four non-*Saccharomyces* species, at both sugar concentrations (Figure 7). The species that most affected the behavior of the consortia was *H. uvarum*. Indeed, increasing initial abundance of *H. uvarum* seemed to decrease yields in glycerol, lactic acid as well as the V_{max} for both sugar concentrations, though to a lesser extent in condition S280. With S200, high initial abundance of *H. uvarum* seemed correlated to lower yields of α -ketoglutaric acid. With S280, *H. uvarum* was correlated with higher yields in acetic acid, and pyruvic acid, as well as higher residual sugar concentration. The other species initial concentration also had an impact on different parameters such as lactic acid and glycerol for *L. thermotolerans*, and glycerol for *S. bacillaris*. Interestingly, the influence of *T. delbrueckii* seemed to change between both sugar conditions. Indeed, it tended to be slightly correlated with a higher acetic acid yield in condition S200, whereas it was associated with a reduced yield in acetic acid at S280. Overall, correlation between initial abundance and fermentation parameters were reduced in the S280 condition. It should however be noted that these correlations to the initial abundance should be interpreted with caution since the range of initial abundances was rather small and varied between species. Moreover, we also observed a correlation between the initial concentration of *L. thermotolerans* and α diversity (Shannon index). Therefore, in our experiment there is no total independence between these two parameters. This is due to the small number of ecosystems we tested. It would be interesting to complete this experiment with a less complete phenotyping in a very large number of ecosystems to have more variation in diversity (by also varying the number of species) and for this to be completely independent of the initial frequency of a given species.

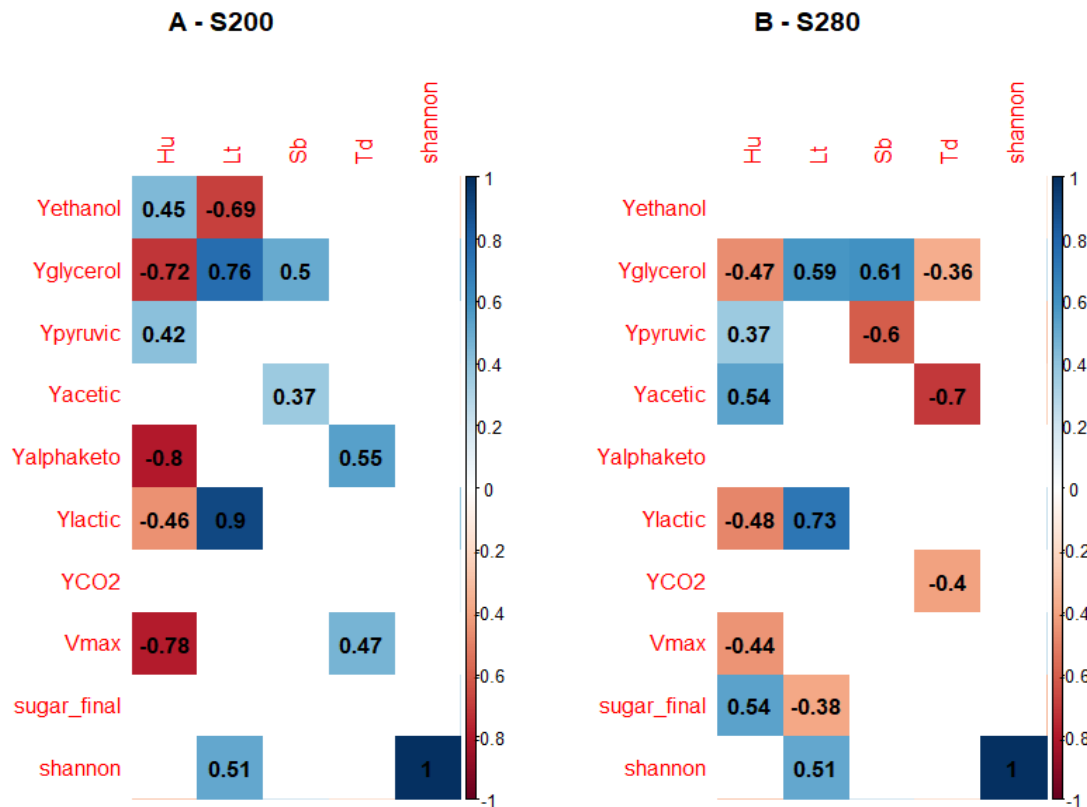


Figure 7: Correlation matrix between initial abundance of the different NS species in consortia C02 to C11 (all inoculated with 5% of *S. cerevisiae*) and fermentation performance (Y: yield in metabolites and CO₂, Vmax: maximum CO₂ production rate, sugar_final: residual sugar concentration). Only significant correlations (p -value < 0.05) are displayed. A: With 200 g/L of sugar. B: With 280 g/L of sugar.

Overall, our experiments proved the usefulness of our previously developed model consortium for studying microbial ecology. However, we have no clear conclusion regarding the impact of diversity or stress factors. Indeed, the phenotypic differences observed at 200 and 280 g/L of sugar were not as pronounced as expected, possibly due to limited stress levels. It should be noted that 200 g/L of sugar alone already represents significant stress. The composition of natural musts vary widely and encompass various stress factors, such as the availability of nutrients like nitrogen sources, lipids and vitamins or presence of inhibitory molecules such as sulfites or polyphenols (Bauer et Pretorius 2000; Tesnière *et al.* 2013). By modifying environmental conditions with our model, we can create conditions that could have a greater impact on the growth of non-*Saccharomyces* yeast species. For example, we could reduce initial levels of nitrogen and lipids. These levels of nutrients would mimic conditions in natural musts where these compounds may be limited. Thus, we can evaluate how nutrient availability influences yeast interaction.

Similarly, the variation in the α diversity in this work may be insufficient to observe a noticeable effect, particularly in our ecosystems in which *S. cerevisiae* rapidly invades the population. If we are to continue studying yeast-yeast interactions with this consortium, it becomes crucial to modify the initial conditions, such as initial frequency or environmental conditions, to prevent *S. cerevisiae* from systematically dominating the environment. We could either reduce its initial frequency by starting inoculation several orders of magnitude less than NS, modify environmental conditions such as lower the temperature to promote non-*Saccharomyces* or reduce the initial nitrogen and lipid content (Mills *et al.* 2002; Bagheri *et al.* 2018). By implementing one or two of these strategies, we can better control the dynamics within our consortium and gain deeper insights into yeast-yeast interactions while reducing the systematic dominance of *S. cerevisiae*.

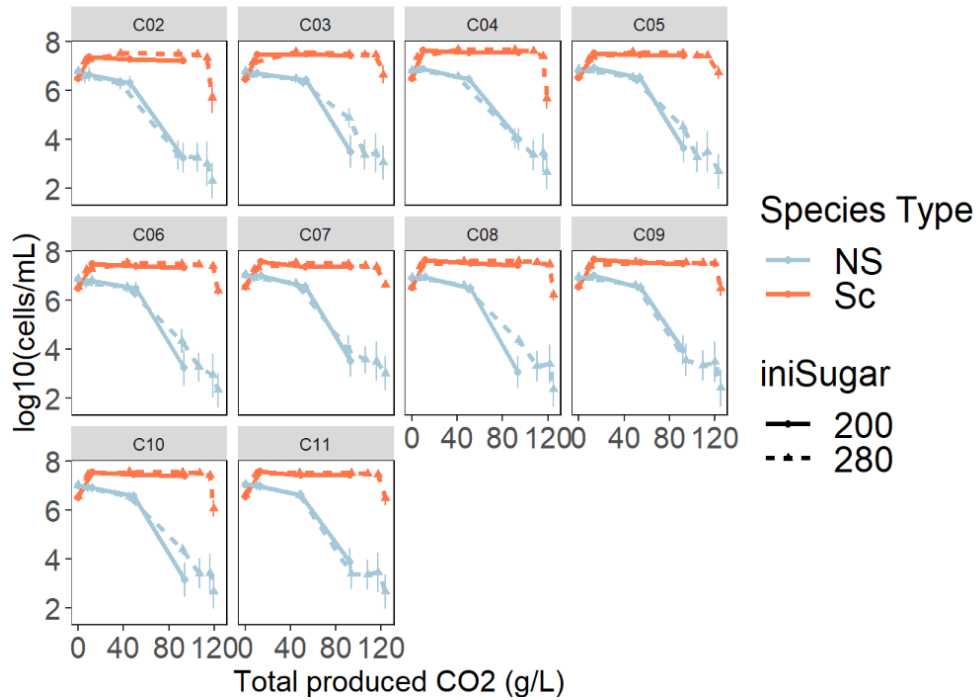
Declaration of interests

None to declare

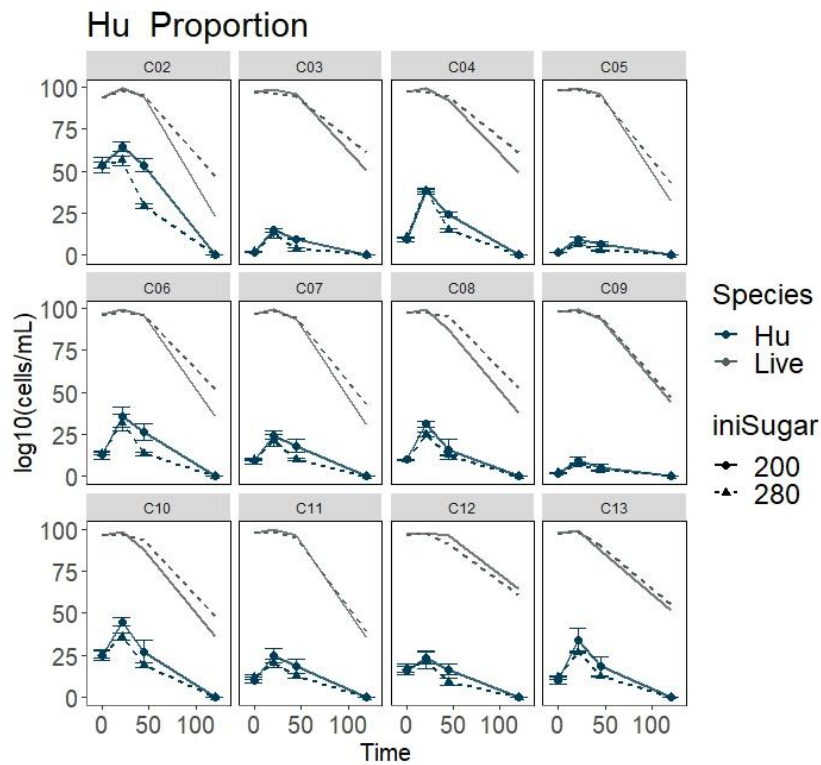
Acknowledgements

We are thankful to F. Macna for carrying out the HPLC analysis and D. Segond for his support with cytometry analysis.

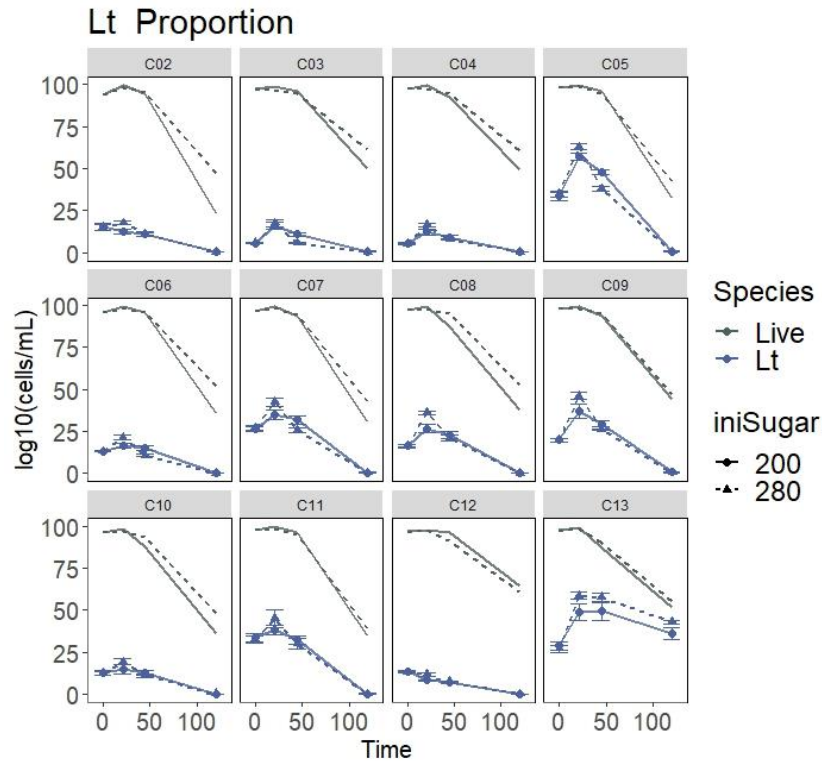
Supplementary Data



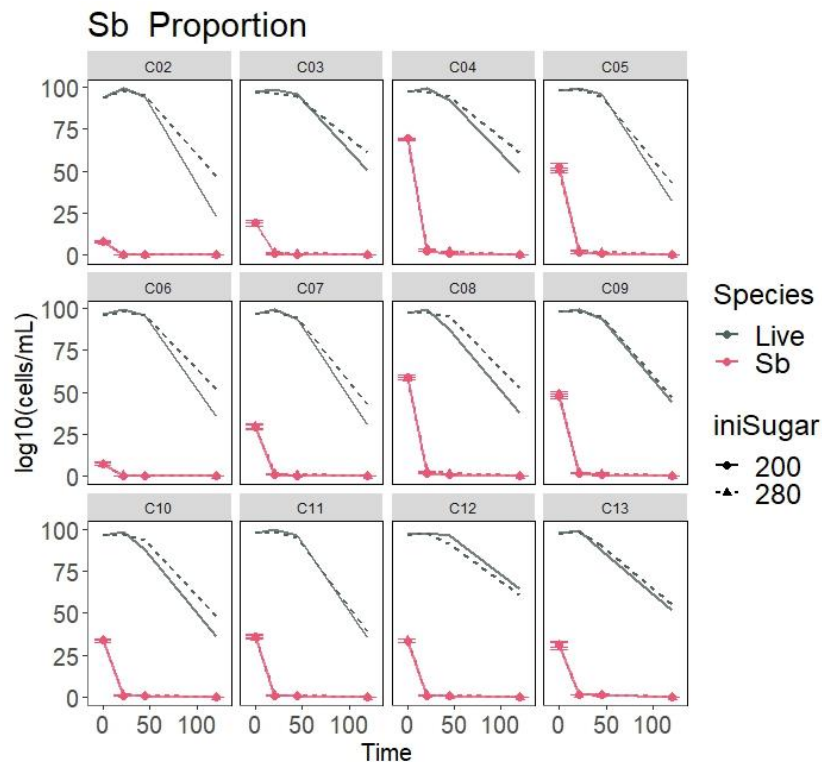
Supplementary Figure 1: Evolution of viable cell count of *S. cerevisiae* (Sc) and non-Saccharomyces (NS) across fermentation progress measured by CO_2 release.



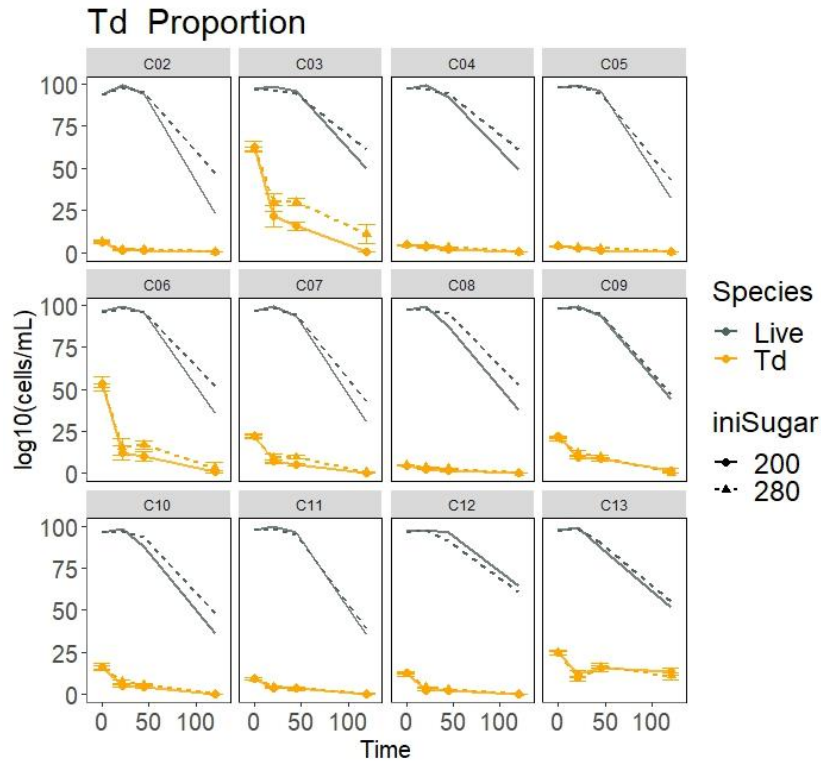
Supplementary Figure 2A: Evolution of abundance of *H. uvarum* (Hu) across fermentation.



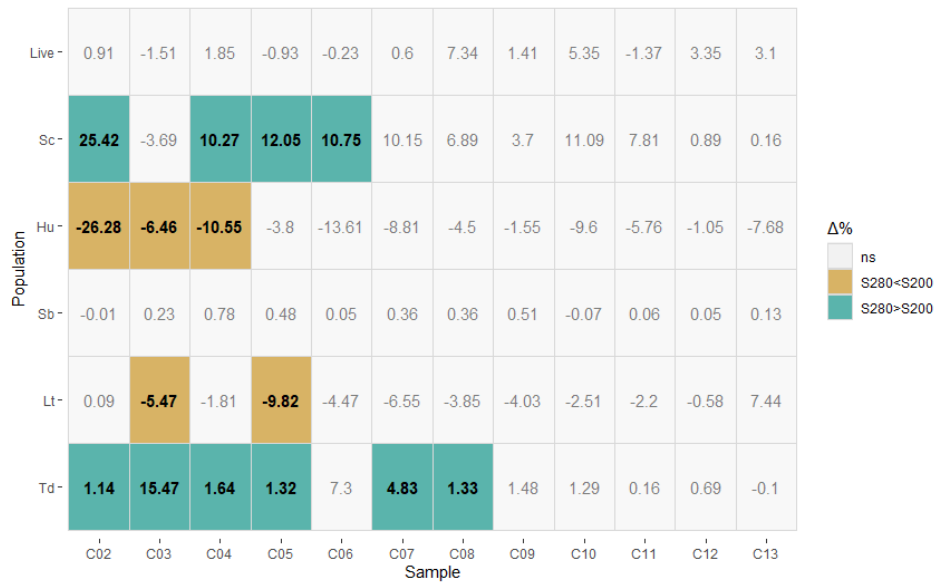
Supplementary Figure 2B: Evolution of abundance of L. thermotolerans (Lt) across fermentation.



Supplementary Figure 2C: Evolution of abundance of S. bacillaris (Sb) across fermentation.

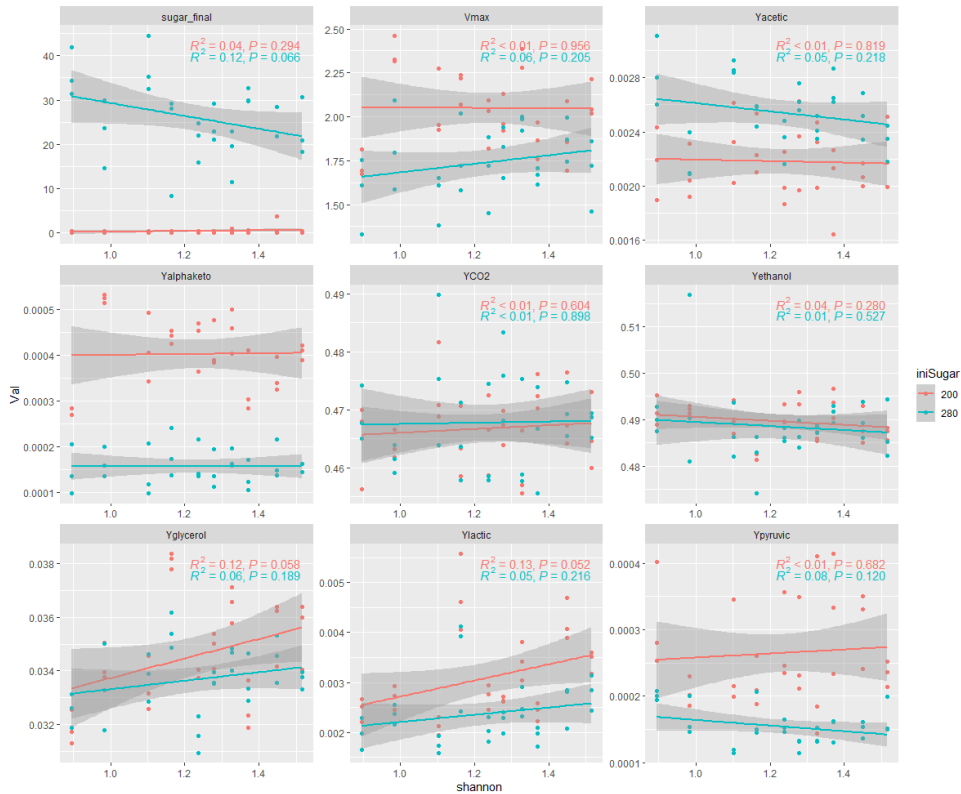


Supplementary Figure 2D: Evolution of abundance of *T. delbrueckii* (*Td*) across fermentation.



Supplementary Figure 3: Matrix of the difference in abundance at 45h of live cells and species between the S200 and S280 conditions. Labels indicate the % difference between S200 and S280 ($\Delta = S280 - S200$). Gray keys indicate non-significant differences (as measured by a T-test on the abundance after transformation with the arcsin function). Colored keys indicate a significant difference between S200 and S280.

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique



Supplementary Figure 4: Correlation between initial diversity, as measured by Shannon index, and fermentation parameters.

Supplementary Table 1: Fermentation kinetics parameters. Different letters indicate statistical differences obtained from TUKEY test between consortia, within a sugar condition.

Sample	IniSugar	CO2max	latency	pop.max.LIve	pop.max.Sc	tfin	tVmax	Vmax
C01	200	95.3 ± 0.959 a	20.6 ± 0.986 a	8.16 ± 0.0685 a	8.16 ± 0.0684 a	119 ± 22 a	24.4 ± 2.71 a	2.55 ± 0.184 a
C02	200	94 ± 1.28 a	20.6 ± 1.02 a	8.08 ± 0.0851 a	7.38 ± 0.0869 b	128 ± 12.4 a	28.4 ± 0.849 a	1.73 ± 0.0763 b
C03	200	93.8 ± 1.11 a	20.6 ± 1.04 a	7.83 ± 0.0851 b	7.49 ± 0.0671 bc	125 ± 14.2 a	28.4 ± 0.856 a	2.37 ± 0.0821 ac
C04	200	95.8 ± 0.697 a	20.6 ± 1.06 a	8 ± 0.0561 ab	7.64 ± 0.0486 c	128 ± 12.4 a	26.5 ± 1.99 a	2.05 ± 0.193 bcde
C05	200	93.9 ± 0.709 a	20.6 ± 1.07 a	8.07 ± 0.0386 a	7.54 ± 0.0338 bc	126 ± 14.2 a	28.4 ± 0.865 a	2.18 ± 0.0928 acde
C06	200	94.2 ± 0.994 a	20.7 ± 1.1 a	7.97 ± 0.154 ab	7.51 ± 0.127 bc	128 ± 12.4 a	27.8 ± 1.89 a	1.98 ± 0.145 bde
C07	200	94.2 ± 0.768 a	20.7 ± 1.12 a	8.07 ± 0.0648 a	7.56 ± 0.0638 bc	126 ± 14.1 a	27.6 ± 1.24 a	2.09 ± 0.106 bcde
C08	200	94.5 ± 1.3 a	20.7 ± 1.13 a	8.07 ± 0.0479 a	7.64 ± 0.0177 c	126 ± 14.1 a	27.8 ± 1.88 a	2 ± 0.111 bcde
C09	200	92.9 ± 0.363 a	20.7 ± 1.15 a	8.06 ± 0.0797 a	7.66 ± 0.0974 c	126 ± 14.1 a	27 ± 1.75 a	2.35 ± 0.0616 acd
C10	200	95.6 ± 0.403 a	20.7 ± 1.16 a	8.05 ± 0.0652 ab	7.58 ± 0.0209 bc	128 ± 12.3 a	27 ± 1.75 a	1.86 ± 0.105 be
C11	200	94.4 ± 0.487 a	20.7 ± 1.18 a	8.1 ± 0.0783 a	7.59 ± 0.0704 bc	128 ± 12.3 a	25.7 ± 0.753 a	1.88 ± 0.198 be
C12	200	95 ± 0.861 a	21.3 ± 0.27 a	8.11 ± 0.00447 a	7.88 ± 0.058 d	134 ± 14.3 a	27.3 ± 1.43 a	2.11 ± 0.0975 cde
C13	200	67.5 ± 3.2 b	20.7 ± 1.2 a	7.99 ± 0.0833 ab	5.81 ± 0.1 e	128 ± 12.3 a	25.7 ± 0.74 a	1.21 ± 0.071 f
C01	280	120 ± 4.54 a	20.7 ± 1.21 a	8.12 ± 0.0486 a	8.12 ± 0.0489 a	149 ± 14.5 ab	24.4 ± 2.47 a	2.46 ± 0.361 a
C02	280	118 ± 2.67 a	22.6 ± 2.08 a	7.89 ± 0.032 bc	7.53 ± 0.0843 b	207 ± 8.99 ab	28.3 ± 0.856 a	1.57 ± 0.216 bc
C03	280	122 ± 3.15 a	21.5 ± 0.274 a	7.81 ± 0.0474 b	7.57 ± 0.051 b	231 ± 47.6 ab	28.3 ± 0.86 a	1.82 ± 0.255 bcd
C04	280	119 ± 5.42 a	21.5 ± 0.274 a	7.84 ± 0.0276 bc	7.69 ± 0.0262 bc	202 ± 10.3 ab	32.9 ± 9.04 a	1.55 ± 0.146 bc
C05	280	123 ± 3.91 a	20.7 ± 1.25 a	7.93 ± 0.0268 bcd	7.58 ± 0.027 b	247 ± 36.6 a	27 ± 1.84 a	1.77 ± 0.225 bcd
C06	280	124 ± 3.92 a	21.6 ± 0.281 a	7.82 ± 0.0463 b	7.56 ± 0.0414 b	239 ± 40.4 a	28.3 ± 0.86 a	1.69 ± 0.22 bcd
C07	280	124 ± 3.12 a	21.6 ± 0.283 a	7.91 ± 0.0506 bcd	7.55 ± 0.0604 b	234 ± 46.2 ab	33.2 ± 10.8 a	1.68 ± 0.204 bcd
C08	280	125 ± 2.59 a	21.6 ± 0.292 a	7.93 ± 0.0942 bcd	7.62 ± 0.0241 bc	231 ± 47.6 ab	28.3 ± 0.864 a	1.81 ± 0.147 bcd
C09	280	125 ± 4.73 a	21.6 ± 0.288 a	7.93 ± 0.0356 bcd	7.59 ± 0.0427 b	233 ± 46.8 ab	27 ± 1.76 a	1.97 ± 0.0421 abd
C10	280	119 ± 1.68 a	21.6 ± 0.296 a	7.94 ± 0.0233 bcd	7.57 ± 0.0729 b	218 ± 59.9 ab	25.6 ± 0.736 a	1.66 ± 0.0471 bc
C11	280	124 ± 0.758 a	20.8 ± 1.35 a	8.07 ± 0.0937 ad	7.6 ± 0.0926 bc	226 ± 51.8 ab	27.7 ± 1.88 a	1.87 ± 0.125 bd
C12	280	119 ± 2.15 a	21.5 ± 0.298 a	8.01 ± 0.0454 acd	7.78 ± 0.0639 c	171 ± 4.37 ab	28 ± 1.35 a	2.25 ± 0.21 ad
C13	280	64.6 ± 1.52 b	21.7 ± 0.3 a	7.97 ± 0.0983 abcd	5.76 ± 0.107 d	126 ± 13.9 b	26.9 ± 1.76 a	1.26 ± 0.0237 c

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

Supplementary Table 2A: Evolution of the average relative abundance of the different populations in consortia C01 to C13 at 200 g/L of reducing sugar.

Consortia	iniSugar	Time	Live	Sc	Hu	Sb	Lt	Td
C01	200	0	98.3 ± 0.572	98.1 ± 0.874	0.193 ± 0.0457	0.044 ± 0.0382	0.263 ± 0.213	0.036 ± 0.042
C01	200	21	98.9 ± 0.558	99.7 ± 0.0718	0.0562 ± 0.0193	0.105 ± 0.0561	0.109 ± 0.0347	0.00594 ± 0.00579
C01	200	45	97.5 ± 0.477	99.5 ± 0.162	0.0376 ± 0.0271	0.0014 ± 0.00242	0.131 ± 0.0319	0.0824 ± 0.0501
C01	200	120	36.6 ± 34.1	88.5 ± 12.3	0.0725 ± 0.102	0 ± 0	3.69 ± 4.63	0.0513 ± 0.0195
C02	200	0	93.9 ± 1.08	8.07 ± 0.41	57.1 ± 7.79	8.72 ± 1.29	16.3 ± 4.06	6.62 ± 1.71
C02	200	21	99.1 ± 0.0813	20.2 ± 4.07	65.1 ± 4.84	0.213 ± 0.0456	12.3 ± 2.47	1.23 ± 0.368
C02	200	45	94.3 ± 2.68	29.4 ± 6.13	57 ± 6.74	0.174 ± 0.0601	11.5 ± 1.9	0.914 ± 0.0404
C02	200	120	23.1 ± 2.56	96.7 ± 0.706	0.0347 ± 0.024	0 ± 0	1.04 ± 0.381	0.0709 ± 0.0374
C03	200	0	97.1 ± 0.436	6.1 ± 1.62	2.02 ± 0.545	19.8 ± 2.97	5.47 ± 0.157	64.7 ± 5.29
C03	200	21	98.6 ± 0.619	45.1 ± 13.3	15.3 ± 1.64	0.93 ± 0.499	16.2 ± 3.52	21.7 ± 11.3
C03	200	45	96.2 ± 0.307	60.5 ± 6.87	10.2 ± 0.698	0.537 ± 0.422	11.4 ± 1.77	16.3 ± 4.55
C03	200	120	50.2 ± 6.21	96.3 ± 1.11	0.0195 ± 0.00992	0 ± 0	1.42 ± 0.922	0.274 ± 0.257
C04	200	0	96.9 ± 0.721	5.73 ± 0.285	9.9 ± 2.04	71.6 ± 0.163	5.9 ± 0.757	4.76 ± 0.638
C04	200	21	99.1 ± 0.27	42.9 ± 3.21	38.6 ± 1.05	2.51 ± 0.553	12.4 ± 3.27	2.89 ± 0.436
C04	200	45	92.6 ± 1.7	59.7 ± 1.9	26.5 ± 3.54	1.35 ± 0.508	9.99 ± 1.38	1.65 ± 0.441
C04	200	120	49.3 ± 1.65	97.8 ± 0.4	0.0182 ± 0.00183	0.00567 ± 0.00553	0.763 ± 0.286	0.0782 ± 0.0401
C05	200	0	98.3 ± 0.252	5.52 ± 0.541	1.81 ± 0.339	53.6 ± 3.74	34.1 ± 4.32	3.68 ± 0.324
C05	200	21	99.5 ± 0.184	28.8 ± 4.96	9.35 ± 2.99	1.7 ± 0.804	57.2 ± 3.81	2.54 ± 0.302
C05	200	45	95.7 ± 1.34	39.8 ± 3.21	6.98 ± 2.32	1.25 ± 0.82	50 ± 2.48	1.22 ± 0.202
C05	200	120	32.3 ± 3.83	95.2 ± 1.72	0.0215 ± 0.018	0.00254 ± 0.0044	1.63 ± 0.832	0.0532 ± 0.0263
C06	200	0	96 ± 0.44	7.35 ± 1.42	13.3 ± 4.4	7.72 ± 1.66	13.8 ± 0.0783	55.2 ± 7.52
C06	200	21	98.9 ± 0.477	33.6 ± 0.576	35.5 ± 9.8	0.339 ± 0.116	17 ± 2.42	12.3 ± 7.45
C06	200	45	95.7 ± 1.88	44.4 ± 2.41	27.7 ± 8.41	0.226 ± 0.0682	15.9 ± 2.98	10.4 ± 4.95
C06	200	120	35.5 ± 1.31	94.4 ± 4.13	0.0204 ± 0.0234	0 ± 0	0.893 ± 0.18	1.98 ± 3.12
C07	200	0	96 ± 1.32	6.74 ± 0.614	9.35 ± 3.39	30.7 ± 2.13	27.8 ± 3.02	23.3 ± 2.54
C07	200	21	99.2 ± 0.0399	31.2 ± 2.11	24.7 ± 4.8	0.937 ± 0.242	35.3 ± 5	6.96 ± 1.58
C07	200	45	93.8 ± 2.18	40.1 ± 0.878	19.2 ± 6.77	0.503 ± 0.327	33.9 ± 4.51	5.15 ± 1.34
C07	200	120	30.8 ± 5.08	95.4 ± 1.05	0.0526 ± 0.0309	0 ± 0	1.43 ± 0.411	0.173 ± 0.14
C08	200	0	97.4 ± 0.55	6.12 ± 0.462	10 ± 1.16	60.5 ± 2.24	16.8 ± 2.26	4.79 ± 0.585
C08	200	21	99.1 ± 0.373	37.1 ± 5.5	31.3 ± 3.44	1.66 ± 0.554	26.8 ± 4.53	2.55 ± 0.589
C08	200	45	87.4 ± 10	52.9 ± 10.8	17.7 ± 10.2	1.17 ± 0.581	26 ± 1.1	1.45 ± 0.143
C08	200	120	37.9 ± 1.34	96.7 ± 1.67	0.0186 ± 0.0161	0 ± 0	1.05 ± 0.523	0.065 ± 0.0189
C09	200	0	98 ± 0.369	5.92 ± 0.345	1.71 ± 0.2	48.5 ± 2.56	20.2 ± 1.82	22.2 ± 1.19
C09	200	21	99 ± 0.483	40.5 ± 11.5	9.71 ± 2.74	1.78 ± 0.528	37.4 ± 6.99	9.78 ± 2.06
C09	200	45	93.8 ± 1.85	52.5 ± 9.49	5.2 ± 4.09	0.859 ± 0.714	31.5 ± 2.66	8.82 ± 2.32
C09	200	120	43.9 ± 5.3	92.5 ± 7.96	0.0233 ± 0.0138	0.00203 ± 0.00351	1.74 ± 1.17	3.53 ± 5.93
C10	200	0	96.3 ± 0.591	6.95 ± 0.414	25.8 ± 5.76	35 ± 0.307	13.3 ± 2.61	17 ± 2.95
C10	200	21	98.6 ± 0.514	32.8 ± 5.02	45.4 ± 4.3	0.936 ± 0.195	15 ± 4.91	4.88 ± 1.16
C10	200	45	87.9 ± 12.4	48.8 ± 12	30 ± 10.2	0.859 ± 0.184	14.5 ± 1.17	4.77 ± 1.73
C10	200	120	36 ± 7.13	96.8 ± 0.616	0.016 ± 0.0177	0 ± 0	0.74 ± 0.0216	0.291 ± 0.214
C11	200	0	97.4 ± 0.341	6.5 ± 0.457	10.3 ± 2.89	37.2 ± 1.95	34.7 ± 4.27	9.63 ± 1.07
C11	200	21	99.4 ± 0.271	30.8 ± 3.25	25.1 ± 7.31	1.01 ± 0.191	38.7 ± 4.71	3.71 ± 0.672
C11	200	45	96 ± 1.85	42.2 ± 5.63	19 ± 7.31	0.873 ± 0.29	33.8 ± 4.47	3.3 ± 1.38
C11	200	120	35 ± 4.9	96.8 ± 0.927	0.0263 ± 0.0208	0.0027 ± 0.00467	0.94 ± 0.24	0.672 ± 0.438
C12	200	0	96.6 ± 0.427	20 ± 2.03	21 ± 6.89	27.3 ± 12.2	18.3 ± 7.02	11.4 ± 2.57
C12	200	21	98 ± 2.02	59.4 ± 7.61	27.3 ± 6.43	0.589 ± 0.326	10.2 ± 2.69	1.96 ± 0.666
C12	200	45	88.2 ± 14	73.7 ± 7.16	12.4 ± 11.6	0.41 ± 0.167	11.1 ± 6.32	1.86 ± 0.444
C12	200	120	58.6 ± 8.69	98.6 ± 0.148	0.0135 ± 0.00422	0.000547 ± 0.000947	0.386 ± 0.132	0.0881 ± 0.0593
C13	200	0	97.2 ± 0.235	0.934 ± 0.125	10.2 ± 4.1	31.9 ± 3	29.6 ± 4.23	25.4 ± 2.54
C13	200	21	98.7 ± 0.671	0.662 ± 0.149	34.4 ± 12.4	1.32 ± 0.073	49.4 ± 9.1	12.2 ± 3.33
C13	200	45	86.7 ± 6.74	0.314 ± 0.0786	21.5 ± 11.2	1.19 ± 0.361	56.7 ± 7.8	18.2 ± 3.71
C13	200	120	51.5 ± 9.83	0.273 ± 0.145	0.105 ± 0.119	0.0119 ± 0.012	70.5 ± 1.95	25.9 ± 2.26
C13	200	168	33.3 ± 5.03	0.422 ± 0.12	0.0712 ± 0.0447	0 ± 0	59.2 ± 4.03	35 ± 3.43
C13	200	210	18.1 ± 7.31	0.821 ± 0.214	0.39 ± 0.515	0 ± 0	33.2 ± 25	56.9 ± 21.3

Supplementary Table 2B: Evolution of the average relative abundance of the different populations in consortia C01 to C13 at 280 g/L of reducing sugar.

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

Consortia	ini	Sugar	Time	Live	Sc	Hu	Sb	Lt	Td
C01	280	0		98.1 ± 0.51	98 ± 0.671	0.194 ± 0.0413	0.0512 ± 0.0173	0.245 ± 0.222	0.0458 ± 0.0462
C01	280	21		98.7 ± 0.419	99.7 ± 0.127	0.0413 ± 0.0363	0.081 ± 0.0517	0.108 ± 0.0374	0.00292 ± 0.00119
C01	280	45		96.2 ± 1.52	99.5 ± 0.179	0.0289 ± 0.0369	0.00872 ± 0.011	0.123 ± 0.00678	0.0613 ± 0.0305
C01	280	120		67.9 ± 18.5	98.5 ± 0.808	0.00873 ± 0.00473	0 ± 0	0.421 ± 0.163	0.0707 ± 0.0658
C01	280	168		22.3 ± 9.56	93.5 ± 4.83	0.0499 ± 0.0228	0 ± 0	1.49 ± 1.59	0.064 ± 0.0643
C01	280	210		4.47 ± 5.14	34.2 ± 47.6	1.73 ± 1.35	0 ± 0	11.9 ± 8.28	0.0794 ± 0.137
C02	280	0		93.5 ± 0.282	8.37 ± 0.951	57.4 ± 3.76	8.63 ± 0.659	16.2 ± 3.52	6.72 ± 0.563
C02	280	21		98.1 ± 0.967	21.1 ± 7.04	57.6 ± 5.5	0.261 ± 0.0416	18.1 ± 2.39	1.98 ± 0.796
C02	280	45		95.2 ± 0.541	54.8 ± 4.16	30.7 ± 2.76	0.162 ± 0.0883	11.6 ± 2.68	2.05 ± 0.256
C02	280	120		46.8 ± 3.47	98.1 ± 0.844	0.0308 ± 0.0273	0 ± 0	0.593 ± 0.312	0.0835 ± 0.0549
C02	280	168		44.5 ± 3.33	97.2 ± 1.22	0.0292 ± 0.0135	0 ± 0	0.795 ± 0.592	0.0372 ± 0.0457
C02	280	210		28.3 ± 16.9	93.9 ± 0.397	0.102 ± 0.0991	0 ± 0	1.81 ± 0.714	0.0349 ± 0.0494
C02	280	300		3.91 ± 2.82	38.3 ± 36.7	0.524 ± 0.497	0 ± 0	9.17 ± 4.08	0 ± 0
C03	280	0		96.6 ± 0.395	6.48 ± 1.01	2.11 ± 0.414	19.1 ± 1.4	5.92 ± 0.226	63.8 ± 2.03
C03	280	21		96.7 ± 1.54	34 ± 5.98	13.7 ± 5.16	1.84 ± 0.459	18.2 ± 3.53	31 ± 9.51
C03	280	45		94.7 ± 0.881	56.8 ± 3.6	3.79 ± 1.48	0.769 ± 0.205	5.91 ± 0.536	31.8 ± 4.22
C03	280	120		61.1 ± 5.52	79.9 ± 13.4	0.0357 ± 0.034	0.0084 ± 0.00239	0.861 ± 0.498	17.3 ± 14.1
C03	280	168		43.9 ± 5.04	95.5 ± 0.733	0.0276 ± 0.0126	0 ± 0	1.27 ± 0.517	0.0482 ± 0.0333
C03	280	210		35.9 ± 5.07	93.1 ± 0.0995	0.0676 ± 0.0597	0 ± 0	2 ± 0.00506	0.032 ± 0.0355
C03	280	300		12.9 ± 13.7	65.8 ± 20.4	0.474 ± 0.425	0.00287 ± 0.00497	7.23 ± 3.66	0.00574 ± 0.00994
C04	280	0		97.1 ± 0.342	5.77 ± 0.682	11 ± 0.734	71.2 ± 1.28	5.49 ± 0.696	4.45 ± 0.286
C04	280	21		97.3 ± 1.55	34.8 ± 2.08	39.3 ± 2.31	4.09 ± 0.251	16.9 ± 1.73	4.22 ± 0.58
C04	280	45		94.5 ± 1.5	70 ± 2.15	15.9 ± 2.47	2.13 ± 0.4	8.19 ± 0.248	3.29 ± 0.532
C04	280	120		60.9 ± 0.876	98.5 ± 0.1	0.0226 ± 0.0248	0.0142 ± 0.0176	0.409 ± 0.00958	0.0717 ± 0.0257
C04	280	168		55.1 ± 1.59	97.2 ± 0.582	0.0159 ± 0.00944	0 ± 0	0.678 ± 0.301	0.0596 ± 0.044
C04	280	210		33.5 ± 14	94.7 ± 0.981	0.0957 ± 0.111	0 ± 0	1.51 ± 0.37	0.0491 ± 0.0114
C04	280	300		3.1 ± 1.97	32 ± 31.9	0.958 ± 0.838	0 ± 0	10.7 ± 4.17	0.0149 ± 0.0258
C05	280	0		98.1 ± 0.066	5.88 ± 0.485	1.92 ± 0.262	51.6 ± 2.7	35.7 ± 3.28	3.81 ± 0.246
C05	280	21		98.6 ± 0.825	22.9 ± 1.36	6.66 ± 1.23	2.81 ± 0.716	63.8 ± 3.06	3.28 ± 0.489
C05	280	45		94.7 ± 2.06	51.9 ± 1.62	3.18 ± 0.946	1.72 ± 0.427	40.2 ± 2.04	2.54 ± 0.425
C05	280	120		42.5 ± 0.844	96.4 ± 1.77	0.0335 ± 0.0192	0.0276 ± 0.0285	1.49 ± 1.12	0.218 ± 0.272
C05	280	168		36.6 ± 1.37	95.7 ± 1.79	0.0354 ± 0.00725	0 ± 0	1.07 ± 0.673	0.0283 ± 0.0252
C05	280	210		33.9 ± 1.17	92.9 ± 4.89	0.0878 ± 0.0413	0 ± 0	2.88 ± 2.29	0.0211 ± 0.0091
C05	280	300		10.6 ± 5.84	71.2 ± 30.1	0.463 ± 0.696	0 ± 0	5.06 ± 4.32	0.0156 ± 0.0271
C06	280	0		95.7 ± 0.61	7.75 ± 1.4	14.1 ± 1.06	7.53 ± 0.956	13.8 ± 0.742	54.6 ± 2.24
C06	280	21		97.7 ± 1.26	27.2 ± 7.93	32.8 ± 9.1	0.418 ± 0.0975	21.9 ± 2.99	16.1 ± 8.61
C06	280	45		95.4 ± 0.696	55.1 ± 3.41	14.1 ± 1.83	0.273 ± 0.0823	11.5 ± 1.55	17.7 ± 4.35
C06	280	120		51.8 ± 6.14	91.5 ± 9.15	0.0296 ± 0.0158	0.00597 ± 0.00603	0.722 ± 0.387	6.04 ± 9.6
C06	280	168		43.8 ± 5.18	97.2 ± 0.712	0.0329 ± 0.0241	0 ± 0	0.623 ± 0.224	0.0341 ± 0.0112
C06	280	210		35.1 ± 4.21	95.4 ± 0.547	0.0787 ± 0.0907	0 ± 0	1.57 ± 0.188	0.0256 ± 0.0362
C06	280	300		5.62 ± 1.99	65.8 ± 22.5	0.347 ± 0.343	0 ± 0	5.48 ± 2.44	0 ± 0
C07	280	0		96.7 ± 0.307	6.76 ± 1.1	9.98 ± 0.269	30.6 ± 2.97	28.3 ± 2.62	22.4 ± 1.52
C07	280	21		98.6 ± 0.594	23.6 ± 7.49	21.7 ± 5.82	1.27 ± 0.134	43 ± 5.11	9.28 ± 4.56
C07	280	45		94.4 ± 0.682	50.3 ± 4.39	10.4 ± 1.21	0.859 ± 0.178	27.4 ± 3.03	9.99 ± 1.91
C07	280	120		42.6 ± 5.11	95.1 ± 2.74	0.0251 ± 0.0339	0.0116 ± 0.0153	1.31 ± 0.821	1.7 ± 2.56
C07	280	168		37.8 ± 6.28	95.8 ± 0.337	0.024 ± 0.00754	0.00306 ± 0.00529	0.905 ± 0.253	0.046 ± 0.0332
C07	280	210		30.1 ± 2.71	93.1 ± 2.09	0.0878 ± 0.0582	0 ± 0	2.4 ± 1.29	0.0409 ± 0.00295
C07	280	300		7.51 ± 1.86	70.3 ± 11.9	0.381 ± 0.312	0 ± 0	5.33 ± 0.872	0.0365 ± 0.0433
C08	280	0		97.1 ± 0.391	6.08 ± 0.53	9.75 ± 0.662	59.8 ± 1.45	17.1 ± 1.37	4.83 ± 0.362
C08	280	21		97.9 ± 0.673	30.5 ± 2.64	25.5 ± 2.4	2.78 ± 0.256	36.9 ± 2.25	3.64 ± 0.213
C08	280	45		94.7 ± 1.53	59.8 ± 3.53	13.2 ± 0.641	1.54 ± 0.431	22.1 ± 3.44	2.78 ± 0.244
C08	280	120		52.6 ± 5.03	98.2 ± 0.591	0.0144 ± 0.00497	0.0145 ± 0.00866	0.602 ± 0.248	0.0941 ± 0.0355
C08	280	168		48.5 ± 3.52	97.9 ± 0.653	0.0217 ± 0.0139	0 ± 0	0.515 ± 0.0365	0.0449 ± 0.0281
C08	280	210		36.5 ± 9.29	95.8 ± 0.823	0.0411 ± 0.00491	0 ± 0	1.19 ± 0.0605	0.0271 ± 0.0148
C08	280	300		3.89 ± 1.59	57.7 ± 21.8	0.991 ± 1.21	0 ± 0	5.78 ± 3.09	0 ± 0

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

Supplementary Table 2B (continued): Evolution of the average relative abundance of the different populations in consortia C01 to C13 at 280 g/L of reducing sugar.

Consortia	iniSugar	Time	Live	Sc	Hu	Sb	Lt	Td
C09	280	0	97.8 ± 0.3	5.94 ± 0.874	2.04 ± 0.153	49.9 ± 2.54	20.1 ± 1.8	20.6 ± 1.51
C09	280	21	97.9 ± 1.07	29.9 ± 3.35	7.05 ± 1.13	2.44 ± 0.0766	47.2 ± 3.59	12.2 ± 2.95
C09	280	45	95.2 ± 0.985	56.2 ± 2.35	3.65 ± 0.586	1.37 ± 0.195	27.5 ± 0.718	10.3 ± 2.26
C09	280	120	47 ± 0.871	97.4 ± 0.496	0.0392 ± 0.0369	0.00185 ± 0.0032	0.884 ± 0.143	0.171 ± 0.0597
C09	280	168	44.5 ± 1.76	97.4 ± 0.644	0.0232 ± 0.0203	0 ± 0	0.67 ± 0.165	0.0474 ± 0.0313
C09	280	210	37.9 ± 1.96	94.8 ± 1.48	0.0446 ± 0.0457	0 ± 0	2 ± 0.748	0.0386 ± 0.0236
C09	280	300	7.21 ± 6.24	67.5 ± 22.7	0.713 ± 0.817	0 ± 0	5.29 ± 3.24	0 ± 0
C10	280	0	95.8 ± 0.251	7.1 ± 0.783	26.7 ± 4.02	35 ± 2.11	13 ± 2	16.2 ± 2.17
C10	280	21	96.6 ± 1.62	32.7 ± 2.26	37.1 ± 3.48	1.26 ± 0.124	20.1 ± 3.44	7.69 ± 1.55
C10	280	45	93.2 ± 1.05	59.9 ± 1.68	20.4 ± 2.61	0.785 ± 0.123	11.9 ± 2.13	6.06 ± 1.56
C10	280	120	48.1 ± 4.7	96.7 ± 1.84	0.022 ± 0.00374	0.0117 ± 0.00727	0.846 ± 0.366	0.133 ± 0.0112
C10	280	168	44.8 ± 1.31	95.7 ± 2.39	0.0289 ± 0.011	0 ± 0	0.911 ± 0.594	0.0461 ± 0.0101
C10	280	210	34.2 ± 1.15	94.9 ± 1.48	0.0671 ± 0.0553	0 ± 0	1.48 ± 0.386	0.0456 ± 0.0544
C10	280	300	4.81 ± 3.16	42.7 ± 32.9	0.685 ± 0.604	0 ± 0	8.98 ± 4.3	0.0099 ± 0.0172
C11	280	0	97.4 ± 0.346	7.27 ± 2.04	12 ± 2.47	36.3 ± 1.8	33.6 ± 4.21	9.16 ± 1.14
C11	280	21	98.6 ± 0.611	27.2 ± 12	20.5 ± 4.28	1.41 ± 0.294	45.6 ± 9.15	4.35 ± 1.18
C11	280	45	94.6 ± 1.88	50 ± 7.37	13.2 ± 2.56	0.935 ± 0.148	31.6 ± 5.07	3.46 ± 0.884
C11	280	120	39 ± 5.54	97.2 ± 1.19	0.0226 ± 0.0102	0 ± 0	0.881 ± 0.53	0.0621 ± 0.0261
C11	280	168	37.4 ± 6.36	96.2 ± 1.44	0.0379 ± 0.00989	0 ± 0	0.767 ± 0.308	0.0331 ± 0.00525
C11	280	210	33.3 ± 6.63	93.7 ± 3.56	0.061 ± 0.0142	0 ± 0	1.81 ± 0.724	0.0332 ± 0.0367
C11	280	300	7.13 ± 5.46	64.8 ± 28.4	0.629 ± 0.84	0 ± 0	5.91 ± 5.37	0.00571 ± 0.00989
C12	280	0	96 ± 0.466	19.8 ± 1.47	22.3 ± 6.79	27.5 ± 12	17.7 ± 6.98	10.6 ± 2.41
C12	280	21	97.7 ± 1.12	55.8 ± 9.61	24 ± 7.69	0.842 ± 0.407	14.9 ± 4.34	3.82 ± 0.438
C12	280	45	91.5 ± 2.39	74.6 ± 4.85	11.4 ± 3.16	0.464 ± 0.215	10.5 ± 4.26	2.55 ± 0.724
C12	280	120	58.8 ± 3.17	98.3 ± 0.195	0.018 ± 0.0194	0 ± 0	0.433 ± 0.13	0.0771 ± 0.0691
C12	280	168	42.5 ± 4.53	97.1 ± 1.05	0.0332 ± 0.0262	0 ± 0	0.556 ± 0.18	0.0528 ± 0.0506
C12	280	210	6.21 ± 1.6	76 ± 7.03	0.486 ± 0.457	0 ± 0	5.61 ± 3.07	0.0521 ± 0.0101
C12	280	300	1.4 ± 0.195	2.63 ± 1.02	1.78 ± 1.49	0 ± 0	15.9 ± 5.16	0 ± 0
C13	280	0	96.8 ± 0.194	0.865 ± 0.232	12.2 ± 2.06	31.8 ± 4.07	28.1 ± 3.95	25.2 ± 1.88
C13	280	21	98.1 ± 1.47	0.609 ± 0.0304	27.3 ± 1.36	1.38 ± 0.151	59.6 ± 2.68	9.34 ± 3.05
C13	280	45	89.8 ± 1.91	0.479 ± 0.0104	13.8 ± 1.09	1.32 ± 0.522	64.1 ± 3	18.1 ± 2.25
C13	280	120	55.4 ± 2.19	0.241 ± 0.0282	0.0537 ± 0.0248	0.00882 ± 0.00764	77.5 ± 6.13	19.2 ± 5.75
C13	280	168	38.8 ± 0.419	0.233 ± 0.0601	0.0731 ± 0.0459	0.00244 ± 0.00422	73.7 ± 5.64	21.5 ± 4.93
C13	280	210	14.5 ± 6.44	0.652 ± 0.317	0.277 ± 0.276	0 ± 0	39.7 ± 30.9	47.2 ± 23.8

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

Supplementary Table 3A: Average cell concentration (in log) at S200

Sample	ini	Sugar	Time	Total	Live	Sc	Hu	Sb	Lt	Td
C01	200	0	7.8 ± 0.0343	7.79 ± 0.0357	7.78 ± 0.0393	5.07 ± 0.102	4.32 ± 0.395	5.12 ± 0.291	4.14 ± 0.528	
C01	200	21	8.17 ± 0.0697	8.16 ± 0.0685	8.16 ± 0.0684	4.89 ± 0.145	5.15 ± 0.247	5.18 ± 0.225	2.72 ± 2.35	
C01	200	45	7.89 ± 0.102	7.87 ± 0.104	7.87 ± 0.104	4.36 ± 0.452	1.2 ± 2.08	4.98 ± 0.21	4.74 ± 0.341	
C01	200	120	7.99 ± 0.0304	7.32 ± 0.619	7.26 ± 0.682	3.7 ± 0.348	0 ± 0	5.58 ± 0.171	4.01 ± 0.612	
C02	200	0	7.62 ± 0.0542	7.59 ± 0.0585	6.5 ± 0.0561	7.34 ± 0.108	6.53 ± 0.0615	6.79 ± 0.0883	6.4 ± 0.0952	
C02	200	21	8.08 ± 0.0852	8.08 ± 0.0851	7.38 ± 0.089	7.89 ± 0.0854	5.4 ± 0.182	7.16 ± 0.175	6.15 ± 0.212	
C02	200	45	7.83 ± 0.0238	7.8 ± 0.0357	7.26 ± 0.102	7.55 ± 0.0716	5.02 ± 0.122	6.85 ± 0.041	5.76 ± 0.0205	
C02	200	120	7.87 ± 0.0481	7.24 ± 0.0444	7.22 ± 0.0423	3.69 ± 0.357	0 ± 0	5.23 ± 0.196	4.05 ± 0.254	
C03	200	0	7.71 ± 0.103	7.69 ± 0.103	6.47 ± 0.0328	5.99 ± 0.0713	6.99 ± 0.0425	6.43 ± 0.0919	7.5 ± 0.139	
C03	200	21	7.82 ± 0.119	7.81 ± 0.117	7.45 ± 0.00815	6.99 ± 0.154	5.72 ± 0.419	7.01 ± 0.163	7.11 ± 0.355	
C03	200	45	7.72 ± 0.0413	7.7 ± 0.0413	7.48 ± 0.076	6.71 ± 0.0399	5.31 ± 0.401	6.75 ± 0.0316	6.9 ± 0.117	
C03	200	120	7.75 ± 0.0135	7.45 ± 0.0655	7.43 ± 0.0697	3.7 ± 0.174	0 ± 0	5.55 ± 0.229	4.76 ± 0.359	
C04	200	0	7.74 ± 0.022	7.73 ± 0.0201	6.48 ± 0.00293	6.71 ± 0.0932	7.58 ± 0.0211	6.49 ± 0.0675	6.4 ± 0.0727	
C04	200	21	8 ± 0.0572	8 ± 0.0561	7.63 ± 0.0607	7.59 ± 0.0467	6.39 ± 0.144	7.08 ± 0.14	6.46 ± 0.121	
C04	200	45	7.82 ± 0.0296	7.79 ± 0.0375	7.56 ± 0.0508	7.21 ± 0.0262	5.9 ± 0.191	6.78 ± 0.0961	5.99 ± 0.109	
C04	200	120	7.87 ± 0.0218	7.56 ± 0.0362	7.55 ± 0.035	3.82 ± 0.0721	2.3 ± 2	5.42 ± 0.203	4.41 ± 0.268	
C05	200	0	7.79 ± 0.0739	7.78 ± 0.074	6.52 ± 0.0594	6.03 ± 0.0516	7.51 ± 0.0503	7.31 ± 0.127	6.34 ± 0.112	
C05	200	21	8.07 ± 0.0387	8.07 ± 0.0386	7.52 ± 0.0524	7.02 ± 0.16	6.27 ± 0.228	7.83 ± 0.0675	6.47 ± 0.0215	
C05	200	45	7.89 ± 0.0898	7.87 ± 0.0844	7.47 ± 0.0493	6.7 ± 0.203	5.91 ± 0.34	7.57 ± 0.099	5.95 ± 0.0995	
C05	200	120	7.93 ± 0.071	7.43 ± 0.0216	7.41 ± 0.014	3.66 ± 0.392	1.1 ± 1.91	5.61 ± 0.233	4.13 ± 0.22	
C06	200	0	7.65 ± 0.0814	7.63 ± 0.0809	6.49 ± 0.0225	6.74 ± 0.062	6.51 ± 0.0154	6.77 ± 0.0788	7.37 ± 0.142	
C06	200	21	7.98 ± 0.156	7.97 ± 0.154	7.5 ± 0.147	7.51 ± 0.0699	5.48 ± 0.326	7.2 ± 0.212	6.99 ± 0.505	
C06	200	45	7.78 ± 0.0476	7.76 ± 0.0392	7.41 ± 0.0448	7.19 ± 0.0959	5.1 ± 0.184	6.96 ± 0.123	6.74 ± 0.298	
C06	200	120	7.82 ± 0.0822	7.37 ± 0.0875	7.34 ± 0.0766	2.56 ± 2.23	0 ± 0	5.31 ± 0.151	5.12 ± 0.908	
C07	200	0	7.73 ± 0.0918	7.72 ± 0.0859	6.54 ± 0.0559	6.67 ± 0.0738	7.2 ± 0.0815	7.16 ± 0.129	7.08 ± 0.13	
C07	200	21	8.07 ± 0.0649	8.07 ± 0.0648	7.56 ± 0.0638	7.46 ± 0.0748	6.03 ± 0.174	7.61 ± 0.102	6.9 ± 0.161	
C07	200	45	7.8 ± 0.0475	7.77 ± 0.0374	7.37 ± 0.0421	7.03 ± 0.162	5.41 ± 0.248	7.3 ± 0.0694	6.47 ± 0.148	
C07	200	120	7.89 ± 0.117	7.37 ± 0.187	7.35 ± 0.183	4.02 ± 0.423	0 ± 0	5.51 ± 0.278	4.51 ± 0.546	
C08	200	0	7.75 ± 0.0327	7.74 ± 0.0329	6.53 ± 0.0462	6.74 ± 0.0184	7.52 ± 0.0349	6.96 ± 0.0876	6.42 ± 0.0825	
C08	200	21	8.08 ± 0.0493	8.07 ± 0.0479	7.64 ± 0.0177	7.57 ± 0.0823	6.28 ± 0.165	7.5 ± 0.115	6.47 ± 0.0989	
C08	200	45	7.86 ± 0.0421	7.8 ± 0.0919	7.51 ± 0.0533	6.98 ± 0.384	5.83 ± 0.258	7.21 ± 0.11	5.96 ± 0.116	
C08	200	120	7.86 ± 0.0783	7.43 ± 0.0934	7.42 ± 0.0936	2.59 ± 2.25	0 ± 0	5.4 ± 0.304	4.23 ± 0.224	
C09	200	0	7.79 ± 0.0208	7.78 ± 0.0208	6.55 ± 0.0176	6.01 ± 0.0688	7.46 ± 0.02	7.08 ± 0.0523	7.12 ± 0.0409	
C09	200	21	8.06 ± 0.081	8.06 ± 0.0797	7.66 ± 0.0974	7.04 ± 0.162	6.3 ± 0.184	7.63 ± 0.148	7.04 ± 0.17	
C09	200	45	7.85 ± 0.0997	7.82 ± 0.106	7.54 ± 0.071	6.35 ± 0.668	5.66 ± 0.385	7.32 ± 0.141	6.76 ± 0.221	
C09	200	120	7.89 ± 0.0248	7.53 ± 0.0298	7.49 ± 0.0637	3.84 ± 0.278	1.1 ± 1.91	5.7 ± 0.26	5.22 ± 1.13	
C10	200	0	7.7 ± 0.0305	7.68 ± 0.0313	6.52 ± 0.0393	7.09 ± 0.0943	7.23 ± 0.0324	6.8 ± 0.0942	6.91 ± 0.096	
C10	200	21	8.05 ± 0.0657	8.05 ± 0.0652	7.56 ± 0.0488	7.7 ± 0.101	6.01 ± 0.117	7.21 ± 0.168	6.73 ± 0.145	
C10	200	45	7.83 ± 0.0388	7.78 ± 0.0787	7.45 ± 0.118	7.24 ± 0.172	5.7 ± 0.128	6.93 ± 0.114	6.43 ± 0.256	
C10	200	120	7.87 ± 0.00159	7.42 ± 0.0924	7.4 ± 0.0948	2.53 ± 2.2	0 ± 0	5.29 ± 0.0863	4.8 ± 0.358	
C11	200	0	7.76 ± 0.0284	7.75 ± 0.0288	6.56 ± 0.0154	6.75 ± 0.115	7.32 ± 0.0165	7.29 ± 0.0756	6.73 ± 0.0759	
C11	200	21	8.1 ± 0.0795	8.1 ± 0.0783	7.59 ± 0.0704	7.49 ± 0.126	6.1 ± 0.138	7.68 ± 0.123	6.66 ± 0.152	
C11	200	45	7.83 ± 0.0673	7.82 ± 0.0665	7.44 ± 0.0758	7.07 ± 0.136	5.74 ± 0.225	7.34 ± 0.124	6.3 ± 0.27	
C11	200	120	7.91 ± 0.0248	7.45 ± 0.0564	7.43 ± 0.0526	3.78 ± 0.314	1.1 ± 1.91	5.41 ± 0.153	5.18 ± 0.454	
C12	200	0	7.72 ± 0.0123	7.7 ± 0.0139	7 ± 0.056	7.01 ± 0.135	7.1 ± 0.24	6.94 ± 0.154	6.75 ± 0.109	
C12	200	21	8.12 ± 0.00664	8.11 ± 0.00447	7.88 ± 0.058	7.54 ± 0.106	5.81 ± 0.321	7.11 ± 0.108	6.38 ± 0.165	
C12	200	45	7.91 ± 0.0252	7.85 ± 0.0951	7.71 ± 0.0779	6.4 ± 1.32	5.43 ± 0.301	6.85 ± 0.132	6.11 ± 0.195	
C12	200	120	7.94 ± 0.0231	7.7 ± 0.0737	7.7 ± 0.0734	3.82 ± 0.0721	1 ± 1.73	5.27 ± 0.231	4.59 ± 0.351	
C13	200	0	7.73 ± 0.107	7.72 ± 0.107	5.69 ± 0.139	6.71 ± 0.0621	7.22 ± 0.0681	7.19 ± 0.172	7.12 ± 0.151	
C13	200	21	8 ± 0.0849	7.99 ± 0.0833	5.81 ± 0.1	7.51 ± 0.213	6.11 ± 0.0923	7.68 ± 0.0897	7.07 ± 0.087	
C13	200	45	7.65 ± 0.0984	7.59 ± 0.13	5.08 ± 0.227	6.87 ± 0.282	5.65 ± 0.214	7.34 ± 0.139	6.84 ± 0.151	
C13	200	120	7.73 ± 0.0866	7.43 ± 0.161	4.82 ± 0.422	4.1 ± 0.704	2.5 ± 2.17	7.28 ± 0.151	6.85 ± 0.191	
C13	200	168	7.81 ± 0.0207	7.33 ± 0.0877	4.94 ± 0.0335	4.11 ± 0.351	0 ± 0	7.1 ± 0.0971	6.87 ± 0.0901	
C13	200	210	7.81 ± 0.133	7.04 ± 0.34	4.94 ± 0.243	4.32 ± 0.379	0 ± 0	6.44 ± 0.765	6.77 ± 0.217	

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

Supplementary Table 3B: Average cell concentration (in log) at S280

Sample	ini	Sugar	Time	Total	Live	Sc	Hu	Sb	Lt	Td
C01	280	0	7.81 ± 0.0252	7.8 ± 0.0273	7.79 ± 0.0302	5.08 ± 0.11	4.49 ± 0.141	5.07 ± 0.364	4.31 ± 0.422	
C01	280	21	8.13 ± 0.0504	8.12 ± 0.0486	8.12 ± 0.0489	4.57 ± 0.507	4.98 ± 0.216	5.13 ± 0.182	3.56 ± 0.241	
C01	280	45	7.89 ± 0.0305	7.87 ± 0.0357	7.87 ± 0.0365	4.01 ± 0.716	2.6 ± 2.27	4.96 ± 0.0597	4.62 ± 0.212	
C01	280	120	7.9 ± 0.0348	7.72 ± 0.14	7.72 ± 0.144	3.6 ± 0.301	0 ± 0	5.32 ± 0.133	4.44 ± 0.522	
C01	280	168	7.9 ± 0.0204	7.22 ± 0.198	7.19 ± 0.219	3.89 ± 0.111	0 ± 0	5.22 ± 0.36	3.88 ± 0.634	
C01	280	210	7.96 ± 0.0649	6.4 ± 0.454	5.59 ± 1.11	4.43 ± 0.199	0 ± 0	5.34 ± 0.0969	1.2 ± 2.08	
C02	280	0	7.63 ± 0.0205	7.61 ± 0.0215	6.53 ± 0.0373	7.36 ± 0.0115	6.54 ± 0.0363	6.81 ± 0.124	6.43 ± 0.0581	
C02	280	21	7.9 ± 0.0357	7.89 ± 0.032	7.2 ± 0.13	7.65 ± 0.0717	5.31 ± 0.0807	7.15 ± 0.0843	6.16 ± 0.176	
C02	280	45	7.81 ± 0.059	7.79 ± 0.0571	7.53 ± 0.0869	7.28 ± 0.0182	4.96 ± 0.284	6.84 ± 0.0987	6.1 ± 0.1	
C02	280	120	7.83 ± 0.0236	7.5 ± 0.0445	7.49 ± 0.0451	3.88 ± 0.338	0 ± 0	5.23 ± 0.219	4.35 ± 0.35	
C02	280	168	7.83 ± 0.0317	7.48 ± 0.0633	7.47 ± 0.063	3.92 ± 0.151	0 ± 0	5.31 ± 0.321	3.8 ± 0.627	
C02	280	210	7.95 ± 0.0744	7.36 ± 0.202	7.33 ± 0.201	4.22 ± 0.316	0 ± 0	5.59 ± 0.379	2.17 ± 3.07	
C02	280	300	7.87 ± 0.0288	6.37 ± 0.42	5.71 ± 1.07	3.96 ± 0.611	0 ± 0	5.29 ± 0.256	0 ± 0	
C03	280	0	7.75 ± 0.0419	7.74 ± 0.0405	6.55 ± 0.0258	6.06 ± 0.0455	7.02 ± 0.0106	6.51 ± 0.0264	7.54 ± 0.0543	
C03	280	21	7.63 ± 0.0727	7.62 ± 0.0697	7.15 ± 0.113	6.73 ± 0.121	5.88 ± 0.0738	6.87 ± 0.0209	7.1 ± 0.199	
C03	280	45	7.84 ± 0.0449	7.81 ± 0.0474	7.57 ± 0.051	6.36 ± 0.146	5.69 ± 0.0976	6.58 ± 0.0196	7.31 ± 0.0966	
C03	280	120	7.8 ± 0.0737	7.59 ± 0.107	7.49 ± 0.0499	3.91 ± 0.563	3.5 ± 0.174	5.47 ± 0.262	6.6 ± 0.763	
C03	280	168	7.82 ± 0.0602	7.46 ± 0.0513	7.44 ± 0.0484	3.87 ± 0.23	0 ± 0	5.55 ± 0.173	4.08 ± 0.341	
C03	280	210	7.93 ± 0.0372	7.48 ± 0.0244	7.45 ± 0.0248	4.2 ± 0.426	0 ± 0	5.78 ± 0.0233	3.78 ± 0.675	
C03	280	300	7.89 ± 0.0399	6.84 ± 0.471	6.64 ± 0.599	4.26 ± 0.337	1.1 ± 1.91	5.64 ± 0.21	1.2 ± 2.08	
C04	280	0	7.77 ± 0.0195	7.76 ± 0.0181	6.51 ± 0.0337	6.8 ± 0.0207	7.61 ± 0.0176	6.49 ± 0.0744	6.4 ± 0.0459	
C04	280	21	7.83 ± 0.01	7.82 ± 0.0123	7.36 ± 0.0374	7.41 ± 0.0269	6.43 ± 0.0318	7.04 ± 0.0331	6.44 ± 0.0555	
C04	280	45	7.86 ± 0.0429	7.83 ± 0.0493	7.68 ± 0.0575	7.03 ± 0.0408	6.15 ± 0.112	6.74 ± 0.0625	6.34 ± 0.123	
C04	280	120	7.89 ± 0.00934	7.67 ± 0.00498	7.67 ± 0.00466	3.82 ± 0.541	2.6 ± 2.27	5.29 ± 0.0137	4.51 ± 0.182	
C04	280	168	7.87 ± 0.0251	7.62 ± 0.0292	7.6 ± 0.0282	3.73 ± 0.379	0 ± 0	5.42 ± 0.189	4.27 ± 0.452	
C04	280	210	7.91 ± 0.00768	7.42 ± 0.18	7.39 ± 0.184	4.15 ± 0.533	0 ± 0	5.59 ± 0.0724	4.1 ± 0.281	
C04	280	300	7.91 ± 0.0425	6.35 ± 0.265	5.67 ± 0.73	4.2 ± 0.287	0 ± 0	5.36 ± 0.118	1.1 ± 1.91	
C05	280	0	7.85 ± 0.0463	7.84 ± 0.0463	6.61 ± 0.0137	6.12 ± 0.0149	7.55 ± 0.0295	7.39 ± 0.0849	6.42 ± 0.0721	
C05	280	21	7.94 ± 0.0242	7.93 ± 0.0268	7.29 ± 0.0315	6.75 ± 0.0845	6.37 ± 0.0838	7.74 ± 0.0414	6.44 ± 0.0468	
C05	280	45	7.89 ± 0.0159	7.86 ± 0.024	7.58 ± 0.027	6.35 ± 0.112	6.09 ± 0.0903	7.47 ± 0.0418	6.26 ± 0.0693	
C05	280	120	7.92 ± 0.0222	7.55 ± 0.0219	7.53 ± 0.0295	4 ± 0.35	3.81 ± 0.521	5.64 ± 0.296	4.57 ± 0.693	
C05	280	168	7.89 ± 0.00859	7.45 ± 0.0119	7.43 ± 0.0184	3.99 ± 0.0882	0 ± 0	5.39 ± 0.386	3.76 ± 0.452	
C05	280	210	7.92 ± 0.0343	7.45 ± 0.0193	7.42 ± 0.0422	4.37 ± 0.231	0 ± 0	5.83 ± 0.371	3.75 ± 0.213	
C05	280	300	7.95 ± 0.0432	6.92 ± 0.253	6.73 ± 0.471	4.14 ± 0.519	0 ± 0	5.52 ± 0.19	1.1 ± 1.91	
C06	280	0	7.68 ± 0.0548	7.67 ± 0.0521	6.55 ± 0.0355	6.81 ± 0.0307	6.54 ± 0.00752	6.8 ± 0.0735	7.4 ± 0.0683	
C06	280	21	7.82 ± 0.0543	7.81 ± 0.0529	7.23 ± 0.136	7.31 ± 0.1	5.42 ± 0.147	7.14 ± 0.0469	6.97 ± 0.265	
C06	280	45	7.84 ± 0.0512	7.82 ± 0.0483	7.56 ± 0.0414	6.96 ± 0.044	5.24 ± 0.175	6.87 ± 0.065	7.06 ± 0.153	
C06	280	120	7.82 ± 0.0456	7.53 ± 0.00818	7.49 ± 0.0431	3.94 ± 0.297	2.3 ± 2	5.35 ± 0.219	5.72 ± 0.922	
C06	280	168	7.83 ± 0.0438	7.47 ± 0.0565	7.45 ± 0.0534	3.84 ± 0.474	0 ± 0	5.24 ± 0.226	3.98 ± 0.14	
C06	280	210	7.86 ± 0.0092	7.41 ± 0.043	7.39 ± 0.0405	4.07 ± 0.657	0 ± 0	5.6 ± 0.095	2.07 ± 2.93	
C06	280	300	7.87 ± 0.0369	6.6 ± 0.158	6.4 ± 0.319	3.99 ± 0.273	0 ± 0	5.3 ± 0.0868	0 ± 0	
C07	280	0	7.74 ± 0.0483	7.72 ± 0.0472	6.55 ± 0.0233	6.72 ± 0.0517	7.21 ± 0.00655	7.17 ± 0.088	7.07 ± 0.0771	
C07	280	21	7.92 ± 0.0498	7.91 ± 0.0506	7.26 ± 0.187	7.23 ± 0.0783	6.01 ± 0.0911	7.54 ± 0.0363	6.84 ± 0.255	
C07	280	45	7.87 ± 0.0364	7.85 ± 0.0336	7.55 ± 0.0604	6.86 ± 0.0334	5.77 ± 0.105	7.28 ± 0.0495	6.84 ± 0.0976	
C07	280	120	7.88 ± 0.0275	7.51 ± 0.047	7.48 ± 0.0594	2.62 ± 2.29	2.43 ± 2.14	5.57 ± 0.271	5.29 ± 0.717	
C07	280	168	7.85 ± 0.02	7.43 ± 0.0781	7.41 ± 0.0767	3.79 ± 0.199	1.1 ± 1.91	5.37 ± 0.201	4.02 ± 0.318	
C07	280	210	7.91 ± 0.00776	7.39 ± 0.0313	7.36 ± 0.0216	4.28 ± 0.281	0 ± 0	5.74 ± 0.277	4 ± 0	
C07	280	300	7.92 ± 0.0205	6.79 ± 0.113	6.63 ± 0.188	4.25 ± 0.318	0 ± 0	5.51 ± 0.0428	2.3 ± 2	
C08	280	0	7.78 ± 0.0124	7.76 ± 0.0116	6.55 ± 0.0264	6.75 ± 0.0398	7.54 ± 0.00581	7 ± 0.0472	6.45 ± 0.0446	
C08	280	21	7.94 ± 0.0971	7.93 ± 0.0942	7.41 ± 0.11	7.34 ± 0.0586	6.37 ± 0.0583	7.5 ± 0.114	6.49 ± 0.116	
C08	280	45	7.86 ± 0.0564	7.84 ± 0.0494	7.61 ± 0.0299	6.96 ± 0.034	6.01 ± 0.159	7.18 ± 0.117	6.28 ± 0.0857	
C08	280	120	7.9 ± 0.0511	7.62 ± 0.0119	7.61 ± 0.00999	3.76 ± 0.151	3.73 ± 0.23	5.37 ± 0.192	4.57 ± 0.196	
C08	280	168	7.87 ± 0.0551	7.56 ± 0.0269	7.55 ± 0.0257	3.79 ± 0.428	0 ± 0	5.27 ± 0.0558	4.16 ± 0.275	
C08	280	210	7.93 ± 0.0194	7.49 ± 0.0923	7.47 ± 0.096	4.1 ± 0.144	0 ± 0	5.57 ± 0.114	3.89 ± 0.157	
C08	280	300	7.93 ± 0.0303	6.49 ± 0.229	6.22 ± 0.421	4.25 ± 0.302	0 ± 0	5.21 ± 0.0569	0 ± 0	

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

Supplementary Table 3B (continued): Average cell concentration (in log) at S280

Sample	iniSugar	Time	Total	Live	Sc	Hu	Sb	Lt	Td
C09	280	0	7.81 ± 0.0429	7.8 ± 0.0421	6.57 ± 0.0195	6.11 ± 0.0506	7.5 ± 0.0251	7.1 ± 0.0805	7.11 ± 0.0746
C09	280	21	7.94 ± 0.0397	7.93 ± 0.0356	7.4 ± 0.0261	6.77 ± 0.0522	6.31 ± 0.0223	7.6 ± 0.0579	7 ± 0.129
C09	280	45	7.83 ± 0.11	7.81 ± 0.109	7.56 ± 0.0947	6.37 ± 0.0424	5.94 ± 0.102	7.25 ± 0.121	6.82 ± 0.202
C09	280	120	7.88 ± 0.0325	7.55 ± 0.0377	7.54 ± 0.0398	2.86 ± 2.48	1.1 ± 1.91	5.5 ± 0.0965	4.77 ± 0.119
C09	280	168	7.89 ± 0.0228	7.54 ± 0.0132	7.53 ± 0.0156	3.8 ± 0.348	0 ± 0	5.36 ± 0.102	4.16 ± 0.275
C09	280	210	7.96 ± 0.057	7.54 ± 0.0345	7.51 ± 0.0277	4.02 ± 0.598	0 ± 0	5.82 ± 0.201	4.08 ± 0.249
C09	280	300	7.94 ± 0.0424	6.68 ± 0.38	6.49 ± 0.53	4.33 ± 0.194	0 ± 0	5.33 ± 0.082	0 ± 0
C10	280	0	7.71 ± 0.0385	7.7 ± 0.0387	6.54 ± 0.00987	7.12 ± 0.0373	7.24 ± 0.0519	6.8 ± 0.109	6.9 ± 0.0989
C10	280	21	7.95 ± 0.0303	7.94 ± 0.0233	7.45 ± 0.0143	7.51 ± 0.0332	6.04 ± 0.0604	7.24 ± 0.0978	6.82 ± 0.0959
C10	280	45	7.81 ± 0.0823	7.78 ± 0.0863	7.56 ± 0.0823	7.09 ± 0.0382	5.67 ± 0.13	6.85 ± 0.153	6.55 ± 0.207
C10	280	120	7.87 ± 0.0194	7.56 ± 0.0583	7.54 ± 0.0663	3.89 ± 0.111	3.56 ± 0.241	5.45 ± 0.159	4.68 ± 0.0468
C10	280	168	7.89 ± 0.0207	7.54 ± 0.0227	7.52 ± 0.0335	3.97 ± 0.185	0 ± 0	5.43 ± 0.277	4.19 ± 0.111
C10	280	210	7.92 ± 0.0111	7.45 ± 0.00357	7.43 ± 0.00321	4.19 ± 0.406	0 ± 0	5.62 ± 0.118	3.84 ± 0.763
C10	280	300	7.92 ± 0.0238	6.52 ± 0.366	6.06 ± 0.588	4.18 ± 0.479	0 ± 0	5.43 ± 0.28	1.1 ± 1.91
C11	280	0	7.8 ± 0.0648	7.79 ± 0.0637	6.64 ± 0.0661	6.87 ± 0.0536	7.35 ± 0.0443	7.32 ± 0.119	6.75 ± 0.118
C11	280	21	8.08 ± 0.0911	8.07 ± 0.0937	7.48 ± 0.199	7.38 ± 0.175	6.22 ± 0.129	7.73 ± 0.13	6.7 ± 0.0525
C11	280	45	7.86 ± 0.0481	7.83 ± 0.0555	7.53 ± 0.0115	6.95 ± 0.134	5.8 ± 0.103	7.33 ± 0.123	6.36 ± 0.116
C11	280	120	7.93 ± 0.0406	7.52 ± 0.102	7.5 ± 0.0974	3.84 ± 0.278	0 ± 0	5.41 ± 0.324	4.28 ± 0.247
C11	280	168	7.93 ± 0.0455	7.5 ± 0.123	7.48 ± 0.118	4.07 ± 0.118	0 ± 0	5.36 ± 0.316	4.02 ± 0.122
C11	280	210	7.97 ± 0.0233	7.48 ± 0.0636	7.46 ± 0.0471	4.26 ± 0.166	0 ± 0	5.72 ± 0.242	3.8 ± 0.707
C11	280	300	7.95 ± 0.0228	6.71 ± 0.328	6.49 ± 0.527	4.22 ± 0.424	0 ± 0	5.37 ± 0.196	1.1 ± 1.91
C12	280	0	7.73 ± 0.00231	7.71 ± 0.00434	7.01 ± 0.0357	7.04 ± 0.13	7.11 ± 0.231	6.94 ± 0.16	6.73 ± 0.104
C12	280	21	8.02 ± 0.0411	8.01 ± 0.0454	7.75 ± 0.115	7.37 ± 0.0938	5.89 ± 0.231	7.17 ± 0.135	6.59 ± 0.0635
C12	280	45	7.86 ± 0.043	7.82 ± 0.0479	7.69 ± 0.0733	6.87 ± 0.13	5.45 ± 0.3	6.82 ± 0.115	6.22 ± 0.166
C12	280	120	7.89 ± 0.0449	7.66 ± 0.0639	7.65 ± 0.0634	3.72 ± 0.488	0 ± 0	5.28 ± 0.204	4.43 ± 0.435
C12	280	168	7.87 ± 0.0922	7.5 ± 0.0773	7.49 ± 0.0787	3.92 ± 0.302	0 ± 0	5.23 ± 0.133	4.09 ± 0.431
C12	280	210	7.95 ± 0.015	6.74 ± 0.128	6.62 ± 0.168	4.3 ± 0.364	0 ± 0	5.45 ± 0.123	3.45 ± 0.213
C12	280	300	7.94 ± 0.0269	6.08 ± 0.082	4.48 ± 0.21	4.23 ± 0.289	0 ± 0	5.27 ± 0.194	0 ± 0
C13	280	0	7.73 ± 0.142	7.71 ± 0.142	5.64 ± 0.206	6.79 ± 0.0737	7.21 ± 0.0925	7.16 ± 0.205	7.11 ± 0.175
C13	280	21	7.98 ± 0.0984	7.97 ± 0.0983	5.76 ± 0.107	7.41 ± 0.119	6.11 ± 0.0993	7.75 ± 0.105	6.93 ± 0.0873
C13	280	45	7.68 ± 0.0701	7.64 ± 0.0699	5.32 ± 0.0675	6.78 ± 0.035	5.73 ± 0.246	7.44 ± 0.078	6.89 ± 0.0814
C13	280	120	7.76 ± 0.0588	7.51 ± 0.0431	4.88 ± 0.0172	4.2 ± 0.254	2.4 ± 2.08	7.39 ± 0.0657	6.78 ± 0.109
C13	280	168	7.8 ± 0.0444	7.39 ± 0.0404	4.75 ± 0.153	4.16 ± 0.34	1.1 ± 1.91	7.26 ± 0.0715	6.72 ± 0.0686
C13	280	210	7.8 ± 0.0314	6.93 ± 0.25	4.71 ± 0.0852	4.23 ± 0.17	0 ± 0	6.35 ± 0.822	6.57 ± 0.119

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

Supplementary Table 4A: Concentration (in g/L) of different MCC metabolites at the end of fermentation. Different letters indicate statistical differences obtained from TUKEY test between consortia, within a sugar condition.

Sample	IniSugar	acetic	alphaketo	ethanol	glycerol	lactic	pyruvic	sugar_final
C01	200	0.42 ± 0.0368 a	0.11 ± 0.00905 a	101 ± 0.839 a	6.46 ± 0.1 a	0.477 ± 0.0314 a	0.0286 ± 0.00416 a	0.242 ± 0.181 a
C02	200	0.439 ± 0.0576 a	0.0509 ± 0.00819 bc	99.4 ± 0.404 ab	6.44 ± 0.151 a	0.499 ± 0.0446 a	0.0632 ± 0.0164 a	0.305 ± 0.21 a
C03	200	0.423 ± 0.0434 a	0.106 ± 0.00262 a	99.5 ± 0.926 ab	6.93 ± 0.173 abcd	0.548 ± 0.0497 ab	0.0416 ± 0.00418 a	0.269 ± 0.166 a
C04	200	0.469 ± 0.0637 a	0.0836 ± 0.0153 ad	99.2 ± 1.21 ab	6.76 ± 0.252 abc	0.431 ± 0.0373 a	0.0512 ± 0.0158 a	0.253 ± 0.176 a
C05	200	0.463 ± 0.0484 a	0.0889 ± 0.00351 ad	97.5 ± 0.65 b	7.71 ± 0.118 e	0.959 ± 0.158 b	0.0443 ± 0.00768 a	0.238 ± 0.171 a
C06	200	0.411 ± 0.0428 a	0.0866 ± 0.0113 ad	99.3 ± 0.322 ab	6.7 ± 0.266 abc	0.55 ± 0.051 ab	0.0564 ± 0.0132 a	0.217 ± 0.182 a
C07	200	0.45 ± 0.0567 a	0.0822 ± 0.00278 ad	98.5 ± 1.02 ab	7.18 ± 0.248 bde	0.693 ± 0.044 ab	0.0473 ± 0.00421 a	0.227 ± 0.158 a
C08	200	0.47 ± 0.0703 a	0.0842 ± 0.0109 ad	99.7 ± 1.01 ab	7.05 ± 0.14 bcd	0.538 ± 0.0123 ab	0.0534 ± 0.0146 a	0.238 ± 0.145 a
C09	200	0.457 ± 0.0542 a	0.0916 ± 0.0105 ad	98.3 ± 1.03 ab	7.37 ± 0.155 de	0.692 ± 0.0779 ab	0.0496 ± 0.0285 a	0.427 ± 0.479 a
C10	200	0.407 ± 0.0694 a	0.0672 ± 0.0142 bd	99.8 ± 0.395 ab	6.59 ± 0.232 ac	0.49 ± 0.0335 a	0.066 ± 0.0178 a	0.344 ± 0.29 a
C11	200	0.418 ± 0.0239 a	0.071 ± 0.00857 bd	98.2 ± 1.03 ab	7.16 ± 0.235 bde	0.847 ± 0.0699 ab	0.0617 ± 0.0111 a	1.39 ± 2.08 a
C12	200	0.394 ± 0.023 a	0.0689 ± 0.00913 bd	100 ± 6.08 ab	6.4 ± 0.0311 a	0.449 ± 0.00758 a	0.0531 ± 0.0211 a	0.233 ± 0.199 a
C13	200	0.541 ± 0.0469 a	0.0337 ± 0.00874 c	69.6 ± 3.06 c	5.81 ± 0.188 f	1.8 ± 0.492 c	0.0515 ± 0.00563 a	55.6 ± 5.47 b
C01	280	0.933 ± 0.0437 a	0.0546 ± 0.0218 a	126 ± 3.02 abc	8.61 ± 0.166 abc	0.456 ± 0.0551 ab	0.0372 ± 0.0102 abc	31.3 ± 6.33 ab
C02	280	0.714 ± 0.0719 bc	0.0367 ± 0.0132 a	123 ± 2.52 ab	8.18 ± 0.173 a	0.496 ± 0.0745 ab	0.0505 ± 0.00118 a	35.9 ± 5.35 ab
C03	280	0.58 ± 0.0471 de	0.0435 ± 0.00767 a	131 ± 4.68 c	8.82 ± 0.351 bcd	0.625 ± 0.0489 abc	0.044 ± 0.00676 ab	22.7 ± 7.74 ab
C04	280	0.718 ± 0.00283 bc	0.035 ± 0.0138 a	122 ± 2.82 a	8.44 ± 0.244 ab	0.438 ± 0.0357 a	0.029 ± 0.00103 c	37.4 ± 6.36 a
C05	280	0.674 ± 0.0444 bcd	0.0486 ± 0.0138 a	128 ± 4.22 abc	9.41 ± 0.321 d	0.919 ± 0.214 c	0.0443 ± 0.00852 ab	21.9 ± 11.7 ab
C06	280	0.622 ± 0.0459 bd	0.0436 ± 0.0117 a	130 ± 1.3 bc	8.42 ± 0.218 ab	0.547 ± 0.0631 ab	0.0412 ± 0.00211 abc	20.9 ± 5.52 ab
C07	280	0.614 ± 0.0486 bde	0.0397 ± 0.00198 a	129 ± 1.63 abc	8.89 ± 0.107 bcd	0.74 ± 0.0784 bc	0.044 ± 0.00642 ab	23.2 ± 6.51 ab
C08	280	0.695 ± 0.0159 bcd	0.0389 ± 0.0118 a	128 ± 2.16 abc	8.86 ± 0.176 bcd	0.586 ± 0.0656 ab	0.0332 ± 0.00257 bc	24.3 ± 4.24 ab
C09	280	0.653 ± 0.0256 bd	0.0463 ± 0.00504 a	131 ± 2.21 c	9.29 ± 0.0352 d	0.692 ± 0.0762 abc	0.0375 ± 0.00271 abc	18 ± 5.9 b
C10	280	0.696 ± 0.0305 bcd	0.0342 ± 0.00919 a	126 ± 0.818 abc	8.62 ± 0.203 abc	0.495 ± 0.0529 ab	0.0388 ± 0.00477 abc	30.8 ± 1.68 ab
C11	280	0.662 ± 0.0346 bcd	0.0441 ± 0.0118 a	129 ± 2.03 abc	9.08 ± 0.101 cd	0.681 ± 0.123 cd	0.0396 ± 0.00348 abc	23.9 ± 3.88 ab
C12	280	0.777 ± 0.0345 c	0.0383 ± 0.00826 a	125 ± 0.178 abc	8.38 ± 0.116 ab	0.459 ± 0.0215 ab	0.0282 ± 0.000176 c	30.6 ± 2.66 ab
C13	280	0.499 ± 0.0202 e	0.0304 ± 0.0104 a	66.5 ± 1.01 d	6.04 ± 0.0999 e	1.53 ± 0.192 d	0.0281 ± 0.000858 c	138 ± 7.92 c

Supplementary Table 4B: Yields at the end of fermentation (in g of metabolites / g of consumed sugar) for different MCC metabolites. Different letters indicate statistical differences obtained from TUKEY test between consortia, within a sugar condition.

Sample	IniSugar	Yacetic	Yaliphaketo	YCO2	Yethanol	Yglycerol	Ylactic	Ypyruvic
C01	200	0.00208 ± 0.000167 a	0.000543 ± 0.0000408 a	0.471 ± 0.0065 a	0.5 ± 0.000889 a	0.0319 ± 0.000249 a	0.00236 ± 0.000152 a	0.000141 ± 0.0000204 a
C02	200	0.00217 ± 0.00027 a	0.000252 ± 0.0000419 b	0.465 ± 0.0074 a	0.492 ± 0.0032 ab	0.0319 ± 0.000625 a	0.00247 ± 0.000232 a	0.000312 ± 0.0000797 a
C03	200	0.00209 ± 0.000201 a	0.000523 ± 0.0000924 a	0.464 ± 0.00242 a	0.492 ± 0.000782 ab	0.0343 ± 0.000692 abcd	0.00271 ± 0.000244 a	0.000206 ± 0.0000223 a
C04	200	0.00232 ± 0.000299 a	0.000413 ± 0.0000746 ac	0.474 ± 0.0069 a	0.49 ± 0.00364 ab	0.0334 ± 0.00103 abc	0.00213 ± 0.00018 a	0.000253 ± 0.0000803 a
C05	200	0.00229 ± 0.000225 a	0.000439 ± 0.0000144 ac	0.464 ± 0.00611 a	0.482 ± 0.000834 bc	0.0381 ± 0.000291 ef	0.00474 ± 0.000767 a	0.000219 ± 0.0000372 a
C06	200	0.00203 ± 0.000199 a	0.000428 ± 0.0000565 ac	0.466 ± 0.00687 a	0.491 ± 0.00225 ab	0.0331 ± 0.00135 abc	0.00272 ± 0.00025 a	0.000279 ± 0.0000675 a
C07	200	0.00223 ± 0.000266 a	0.000407 ± 0.0000163 ac	0.466 ± 0.00662 a	0.487 ± 0.00134 abc	0.0355 ± 0.00126 bde	0.00343 ± 0.000221 a	0.000234 ± 0.0000191 a
C08	200	0.00232 ± 0.000331 a	0.000416 ± 0.0000519 ac	0.467 ± 0.00291 a	0.493 ± 0.00314 ab	0.0348 ± 0.000673 bcd	0.00266 ± 0.0000488 a	0.000264 ± 0.0000746 a
C09	200	0.00226 ± 0.000248 a	0.000453 ± 0.0000481 ac	0.46 ± 0.00587 a	0.486 ± 0.00101 bc	0.0365 ± 0.000681 de	0.00342 ± 0.000379 a	0.000246 ± 0.000144 a
C10	200	0.00201 ± 0.000328 a	0.000332 ± 0.000068 bc	0.473 ± 0.00299 a	0.494 ± 0.00314 ab	0.0326 ± 0.000918 ac	0.00242 ± 0.00018 a	0.000327 ± 0.0000902 a
C11	200	0.00208 ± 0.0000872 a	0.000353 ± 0.000038 bc	0.469 ± 0.00634 a	0.488 ± 0.00405 ab	0.0356 ± 0.00125 bde	0.00422 ± 0.000422 a	0.000307 ± 0.0000583 a
C12	200	0.00195 ± 0.000115 a	0.000341 ± 0.0000443 bc	0.47 ± 0.000485 a	0.495 ± 0.00387 ab	0.0316 ± 0.000305 a	0.00222 ± 0.0000207 a	0.000263 ± 0.000107 a
C13	200	0.00369 ± 0.000404 b	0.000231 ± 0.0000644 b	0.46 ± 0.0116 a	0.474 ± 0.0131 c	0.0396 ± 0.00152 f	0.0122 ± 0.00305 b	0.000352 ± 0.000047 a
C01	280	0.00365 ± 0.000128 a	0.000213 ± 0.0000844 a	0.467 ± 0.00728 a	0.492 ± 0.00255 a	0.0336 ± 0.000891 ab	0.00178 ± 0.000195 a	0.000145 ± 0.0000393 abc
C02	280	0.00284 ± 0.000257 bcd	0.000146 ± 0.000055 a	0.469 ± 0.00472 a	0.49 ± 0.00261 a	0.0325 ± 0.000623 a	0.00197 ± 0.000319 a	0.000201 ± 0.0000687 a
C03	280	0.00219 ± 0.000178 e	0.000165 ± 0.0000328 a	0.462 ± 0.00238 a	0.496 ± 0.0186 a	0.0334 ± 0.00161 ab	0.00236 ± 0.000197 ab	0.000167 ± 0.0000291 abc
C04	280	0.00288 ± 0.0000465 bc	0.000141 ± 0.0000586 a	0.476 ± 0.013 a	0.487 ± 0.00585 a	0.0338 ± 0.000882 ab	0.00175 ± 0.000172 a	0.000116 ± 0.00000234 b
C05	280	0.00254 ± 0.0000854 bdef	0.000183 ± 0.0000525 a	0.464 ± 0.00675 a	0.481 ± 0.00629 a	0.0355 ± 0.000665 b	0.00349 ± 0.000932 b	0.000167 ± 0.000034 abc
C06	280	0.00233 ± 0.000163 ef	0.000164 ± 0.0000453 a	0.464 ± 0.00939 a	0.487 ± 0.00147 a	0.0316 ± 0.000686 a	0.00205 ± 0.000244 a	0.000155 ± 0.00000948 abc
C07	280	0.00232 ± 0.000137 ef	0.000151 ± 0.0000105 a	0.468 ± 0.00227 a	0.487 ± 0.00628 a	0.0337 ± 0.000328 ab	0.00281 ± 0.000352 ab	0.000167 ± 0.0000277 abc
C08	280	0.00265 ± 0.000103 bcd	0.000148 ± 0.0000427 a	0.476 ± 0.00761 a	0.487 ± 0.00287 a	0.0337 ± 0.000233 ab	0.00223 ± 0.000216 ab	0.000126 ± 0.0000101 b
C09	280	0.00243 ± 0.0000852 def	0.000172 ± 0.0000205 a	0.464 ± 0.00986 a	0.488 ± 0.000814 a	0.0345 ± 0.000437 ab	0.00257 ± 0.000303 ab	0.000139 ± 0.0000116 bc
C10	280	0.00271 ± 0.000134 bcd	0.000133 ± 0.0000346 a	0.465 ± 0.00926 a	0.491 ± 0.00187 a	0.0336 ± 0.000919 ab	0.00193 ± 0.00019 a	0.000151 ± 0.0000183 abc
C11	280	0.00252 ± 0.000171 bdef	0.000167 ± 0.0000425 a	0.47 ± 0.00465 a	0.49 ± 0.00387 a	0.0345 ± 0.000895 ab	0.00258 ± 0.000431 ab	0.00015 ± 0.0000126 abc
C12	280	0.00303 ± 0.000121 cg	0.000149 ± 0.0000328 a	0.463 ± 0.0117 a	0.488 ± 0.00356 a	0.0327 ± 0.000414 ab	0.00179 ± 0.000091 a	0.00011 ± 0.00000108 b
C13	280	0.00334 ± 0.000211 ag	0.000205 ± 0.0000804 a	0.432 ± 0.0211 b	0.446 ± 0.0272 b	0.0405 ± 0.00221 c	0.0102 ± 0.000874 c	0.000188 ± 0.0000108 abc

References

- Bagheri, B., Zambelli, P., Vigentini, I., Bauer, F.F., Setati, M.E., 2018. Investigating the Effect of Selected Non-*Saccharomyces* Species on Wine Ecosystem Function and Major Volatiles. *Front Bioeng Biotechnol* 6, 169. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00169>
- Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency: How to Survive the Making of Wine - A Review. *SAJEV* 21. <https://doi.org/10.21548/21-1-3557>
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., Benito, S., 2015. Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 1911–1922. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6197-2>
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., Barre, P., 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70, 246–252. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90057-4)
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122, 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>
- Bisson, L.F., 1999. Stuck and Sluggish Fermentations. *Am J Enol Vitic.* 50, 107–119. <https://doi.org/10.5344/ajev.1999.50.1.107>
- Bock, A., Sparks, T.H., Estrella, N., Menzel, A., 2013. Climate-Induced Changes in Grapevine Yield and Must Sugar Content in Franconia (Germany) between 1805 and 2010. *PLoS ONE* 8, e69015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069015>
- Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2014. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 139–48. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317377110>
- Bordet, F., Joran, A., Klein, G., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., 2020. Yeast-Yeast Interactions: Mechanisms, Methodologies and Impact on Composition. *Microorganisms* 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040600>
- Boynton, P.J., Greig, D., 2016. Species richness influences wine ecosystem function through a dominant species. *Fungal Ecology* 22, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.04.008>
- Brückner, S., Schubert, R., Kraushaar, T., Hartmann, R., Hoffmann, D., Jelli, E., Drescher, K., Müller, D.J., Oliver Essen, L., Mösch, H.-U., 2020. Kin discrimination in social yeast is mediated by cell surface receptors of the Flo11 adhesin family. *Elife* 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.55587>
- Bruns, T.D., 2019. The developing relationship between the study of fungal communities and community ecology theory. *Fungal Ecology* 39, 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.12.009>
- Capece, A., Fiore, C., Maraz, A., Romano, P., 2005. Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *J Appl Microbiol* 98, 136–144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02434.x>
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P., 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res* 10, 123–33. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>
- Ciani, M., Maccarelli, F., 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making 14.
- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J.A., Oro, L., Rodrigues, A.J., Gonzalez, R., 2016. Non-conventional Yeast Species for Lowering Ethanol Content of Wines. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00642>
- Conacher, C.G., Naidoo-Blassoples, R.K., Rossouw, D., Bauer, F.F., 2022. A Transcriptomic Analysis of Higher-Order Ecological Interactions in a Eukaryotic Model Microbial Ecosystem. *mSphere* 7, e00436-22. <https://doi.org/10.1128/msphere.00436-22>

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

- Contreras, A., Curtin, C., Varela, C., 2015. Yeast population dynamics reveal a potential 'collaboration' between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 1885–1895. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6193-6>
- Csoma, H., Kállai, Z., Antunovics, Z., Czentye, K., Sipiczki, M., 2020. Vinification without *Saccharomyces*: Interacting Osmotolerant and "Spoilage" Yeast Communities in Fermenting and Ageing Botrytised High-Sugar Wines (Tokaj Essence). *Microorganisms* 9, 19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010019>
- Deroite, A., Legras, J.-L., Rigou, P., Ortiz-Julien, A., Dequin, S., 2018. Lipids modulate acetic acid and thiol final concentrations in wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids. *AMB Expr* 8, 130. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0657-5>
- Ferreira, J., Toit, M.D., Toit, W.J.D., 2006. The effects of copper and high sugar concentrations on growth, fermentation efficiency and volatile acidity production of different commercial wine yeast strains. *Aust J Grape Wine Res* 12, 50–56. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00043.x>
- Fleet, G.H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)
- Gambetta, G.A., Kurtural, S.K., 2021. Global warming and wine quality: are we close to the tipping point? *OENO One* 55, 353–361. <https://doi.org/10.20870/oenone.2021.55.3.4774>
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol* 33, 271–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J.M., Zamora, F., 2015. Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur Food Res Technol* 240, 999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>
- Grangeteau, C., Roullier-Gall, C., Rousseaux, S., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., 2017. Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microb Biotechnol* 10, 354–370. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12428>
- 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, e0233285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233285>
- Heard, G.M., Fleet, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb04312.x>
- Hernandez-Lopez, M.J., Prieto, J.A., Randez-Gil, F., 2003. Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 84, 125–134. <https://doi.org/10.1023/a:1025413520192>
- Hohmann, S., 2009. Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 583, 4025–4029. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.069>
- Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., Arneborg, N., 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 91, 541–547. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01426.x>
- Hooper, D., Chapin, F., Ewel, J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J., Lodge, D., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A., Vandermeer, J., Wardle, D., 2005. Effects of

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

- biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecol Monogr* 75, 3–35. <https://doi.org/10.1890/04-0922>
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., 2006. Role and use of non-*Saccharomyces* in wine production. *SAJEV* 27, 15–39. <https://doi.org/10.21548/27-1-1475>
- Kassambara, A., 2023. rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests.
- 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>
- Kunkee, R.E., 1984. Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiology* 1, 315–332. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(84\)90065-0](https://doi.org/10.1016/0740-0020(84)90065-0)
- Kutyna, D.R., Varela, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Stanley, G.A., 2010. Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends in Food Science & Technology* 21, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.03.004>
- Lages, F., Silva-Graça, M., Lucas, C., 1999. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology* 145, 2577–2585. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2577>
- Li, J., Hu, W., Huang, X., Xu, Y., 2018. Investigation of yeast population diversity and dynamics in spontaneous fermentation of Vidal blanc icewine by traditional culture-dependent and high-throughput sequencing methods. *Food Res Int* 112, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.011>
- Magyar, I., Soós, J., 2016. Botrytized wines – current perspectives. *IJWR Volume 8*, 29–39. <https://doi.org/10.2147/IJWR.S100653>
- Mbuyane, L.L., De Kock, M., Bauer, F.F., Divol, B., 2018. *Torulaspora delbrueckii* produces high levels of C5 and C6 polyols during wine fermentations. *FEMS Yeast Research* 18. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy084>
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., 2012. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 157, 245–50. <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 Microbiol* 94, 103670. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103670>
- Mendoza, L.M., Vega-Lopez, G.A., Fernández de Ullivarri, M., Raya, R.R., 2019. Population and oenological characteristics of non-*Saccharomyces* yeasts associated with grapes of Northwestern Argentina. *Arch Microbiol* 201, 235–244. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1601-4>
- Mills, D.A., Johannsen, E.A., Cocolin, L., 2002. Yeast Diversity and Persistence in Botrytis-Affected Wine Fermentations. *Appl Environ Microbiol* 68, 4884–4893. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4884-4893.2002>
- Mira De Orduña, R., 2010. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International* 43, 1844–1855. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.001>
- Modig, T., Granath, K., Adler, L., Lidén, G., 2007. Anaerobic glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae* strains under hyperosmotic stress. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 289–296. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0821-8>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Colomo, B., Suárez, J.A., 2003. Pyruvic Acid and Acetaldehyde Production by Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae* : Relationship with Vitisin A and B Formation in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7402–7409. <https://doi.org/10.1021/jf0304167>

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

- Nidelet, T., Brial, P., Camarasa, C., Dequin, S., 2016. Diversity of flux distribution in central carbon metabolism of *S. cerevisiae* strains from diverse environments. *Microb Cell Fact* 15, 58. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0456-0>
- Nisiotou, A.A., Spiropoulos, A.E., Nychas, G.-J.E., 2007. Yeast community structures and dynamics in healthy and *Botrytis*-affected grape must fermentations. *Appl Environ Microbiol* 73, 6705–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.01279-07>
- Oláhné Horváth, B., Nyitrai Sárdy, D., Kellner, N., Magyar, I., Szent István University Faculty of Horticultural Science Department of Oenology, Ménesi út 45, 1118 Budapest, Hungary, 2020. Effects of the high sugar content on the fermentation dynamics and some metabolites of wine-related yeast species *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* and *Starmerella bacillaris*. *Food Technol. Biotechnol.* 58, 76–83. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.01.20.6461>
- Pigeau, G.M., Inglis, D.L., 2005. Upregulation of *ALD3* and *GPD1* in *Saccharomyces cerevisiae* during Icewine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 99, 112–125. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02577.x>
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B)
- Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R., Morales, P., 2014. Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *International Journal of Food Microbiology* 181, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024>
- R Core Team, 2023. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G., Rolle, L., Cocolin, L., 2012. *Candida zemplinina* Can Reduce Acetic Acid Produced by *Saccharomyces cerevisiae* in Sweet Wine Fermentations. *Appl Environ Microbiol* 78, 1987–1994. <https://doi.org/10.1128/AEM.06768-11>
- Remize, F., Roustan, J.L., Sablayrolles, J.M., Barre, P., Dequin, S., 1999. Glycerol Overproduction by Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains Leads to Substantial Changes in By-Product Formation and to a Stimulation of Fermentation Rate in Stationary Phase. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 65.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., Bely, M., 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulasporea delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 134, 201–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.008>
- Roudil, L., Russo, P., Berbegal, C., Albertin, W., Spano, G., Capozzi, V., 2020. Non-*Saccharomyces* Commercial Starter Cultures: Scientific Trends, Recent Patents and Innovation in the Wine Sector. *Recent Pat Food Nutr Agric* 11, 27–39. <https://doi.org/10.2174/2212798410666190131103713>
- Ruiz, J., De Celis, M., Diaz-Colunga, J., Vila, J.C., Benitez-Dominguez, B., Vicente, J., Santos, A., Sanchez, A., Belda, I., 2023. Predictability of the community-function landscape in wine yeast ecosystems. *Molecular Systems Biology* 19, e11613. <https://doi.org/10.15252/msb.202311613>
- Schmidt, S.A., Kolouchova, R., Forgan, A.H., Borneman, A.R., 2020. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Competitive Fitness in Enologically Relevant Environments by Barcode Sequencing. *G3 (Bethesda)* 10, 591–603. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400743>
- Shade, A., Peter, H., Allison, S.D., Baho, D.L., Berga, M., Bürgmann, H., Huber, D.H., Langenheder, S., Lennon, J.T., Martiny, J.B.H., Matulich, K.L., Schmidt, T.M., Handelsman, J., 2012. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front Microbiol* 3, 417. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00417>
- Tesnière, C., Delobel, P., Pradal, M., Blondin, B., 2013. Impact of Nutrient Imbalance on Wine Alcoholic Fermentations: Nitrogen Excess Enhances Yeast Cell Death in Lipid-Limited Must. *PLoS ONE* 8, e61645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061645>

Chapitre 4 : Comparaison de l'effet de la diversité initiale des levures sur les propriétés fermentaires en consortia lors de fermentation en stress osmotique

- Tofalo, R., Schirone, M., Torriani, S., Rantsiou, K., Cocolin, L., Perpetuini, G., Suzzi, G., 2012. Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiol* 29, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.014>
- Tondini, F., Onetto, C.A., Jiranek, V., 2020. Early adaptation strategies of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* to co-inoculation in high sugar grape must-like media. *Food Microbiol* 90, 103463. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103463>
- Varela, C., Cuijvers, K., van den Heuvel, S., Rullo, M., Solomon, M., Borneman, A., Schmidt, S., 2021. Effect of Aeration on Yeast Community Structure and Volatile Composition in Uninoculated Chardonnay Wines. *Fermentation* 7, 97. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020097>
- Whiting, G.C., 1976. Organic Acid Metabolism of Yeasts During Fermentation of Alcoholic Beverages— a Review. *Journal of the Institute of Brewing* 82, 84–92. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1976.tb03731.x>
- Windholtz, S., Nioi, C., Coulon, J., Masneuf-Pomarede, I., 2023. Bioprotection by non-*Saccharomyces* yeasts in oenology: Evaluation of O₂ consumption and impact on acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 405, 110338. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110338>

Résultats complémentaires

Lors de ces expérimentations, nous avons également observé des variations de floculation. En effet, certains consortia présentaient une importante et rapide sédimentation. Nous ne présentons ici que des résultats préliminaires, ce phénotype n'étant pas l'objet de notre étude.

La floculation des différents consortia a été évaluée visuellement en fin de fermentation, selon la hauteur de cellules sédimentées au fond des fermenteurs après 5 min sans agitation. Nous avons utilisé une échelle arbitraire allant de 0 à 4, 0 correspondant à une absence de floculation et 4 à une très importante floculation (Figure 11).

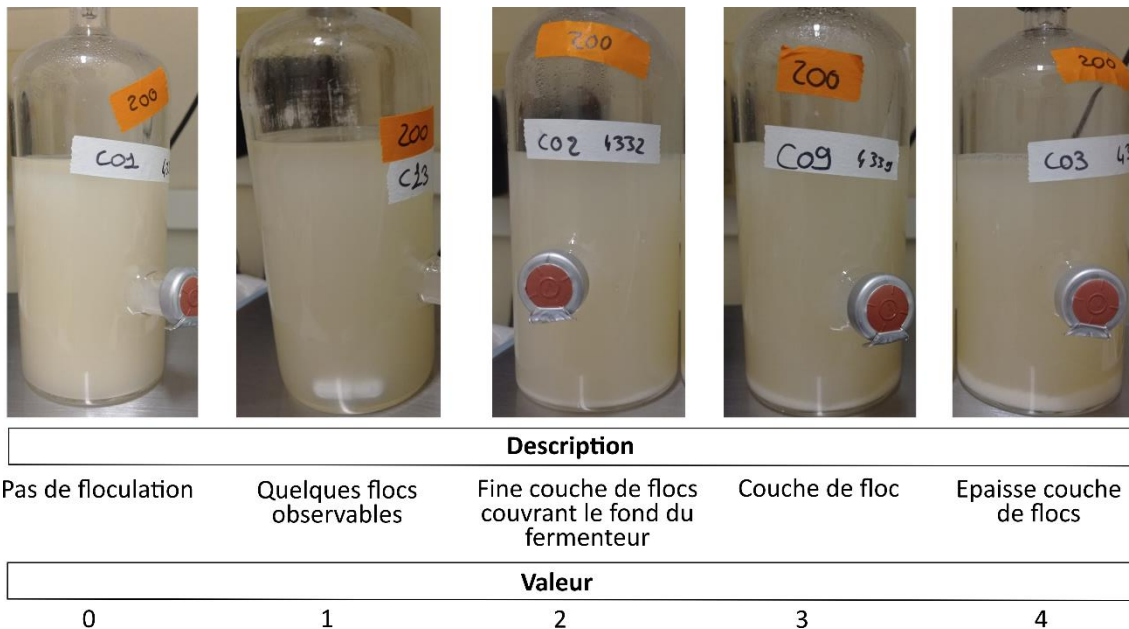


Figure 11 : Description de l'échelle utilisée pour caractériser la floculation

Les mesures ont été effectuées sur deux répliqués dont les résultats sont présentés dans le Tableau 3. Les mono-cultures de *S. cerevisiae* ne montraient aucune floculation, tandis que tous les consortia comportant *S. cerevisiae* montraient une floculation facilement observable (entre 2 et 4). Les consortia avec une plus forte abondance initiale de *T. delbrueckii* (C03, C06 et C09) tendaient à montrer une très forte floculation (entre 3 et 4). Au contraire, les consortia comportant moins de 5% de *T. delbrueckii* au départ, notamment C02, C05 et C08, semblaient généralement montrer une floculation plus modérée. On peut donc supposer que les variations observées résultent en partie de la présence de *T. delbrueckii*, dont la souche CLIB3152 montrait une forte floculation en mono-culture. De plus, il est intéressant de noter

que le consortium C13, qui comporte seulement les 4 espèces NS en équipropotion, ne montrait pas de floculation ou très partielle (entre 0 et 1). Tandis que, la floculation dans le consortium C07, comportant 5% de *S. cerevisiae* et les 4 espèces NS en équipropotion, était très importante dans les deux conditions de sucres initial (entre 3 et 4). Ces observations sembleraient donc indiquer que le phénotype de floculation est à la fois influencé par la présence d'autres espèces, en particulier de *S. cerevisiae*, et par leurs abondances initiales.

Tableau 3 : Résultats des mesures de floculation dans les différents consortia à 200 et 280 g/L de sucres initial.

Consortia	[Sucre initial] (g/L)	Réplicat 1	Réplicat 2
C01	200	0	0
C02	200	2	2
C03	200	4	4
C04	200	3	2
C05	200	2	2
C06	200	4	4
C07	200	4	3
C08	200	2	2
C09	200	3	4
C10	200	2	3
C11	200	3	3
C12	200	2	2
C13	200	1	0
C01	280	0	0
C02	280	2	2
C03	280	4	4
C04	280	2	1
C05	280	3	2
C06	280	3	4
C07	280	4	4
C08	280	3	2
C09	280	3	3
C10	280	3	2
C11	280	3	3
C12	280	2	2
C13	280	1	0

Ces résultats soulignent à nouveau l'importance de la floculation dans les interactions interspécifiques de levures. Chez *S. cerevisiae*, la floculation est notamment contrôlée par l'expression des gènes de la famille *FLO*, dont *FLO1*, *FLO5*, *FLO11* qui codent pour des protéines de la paroi cellulaire (Soares 2011). Il a récemment été montré que la surexpression

de chacune de ces protéines induit des changements différents de dynamique de population dans des consortia de 3 à 4 espèces (Rossouw *et al.* 2018). De plus, en co-culture avec *T. delbrueckii* ou *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae* semble moduler différents gènes impliqués dans la structuration de la paroi, et qui pourrait donc intervenir dans des mécanismes de contact tels que la floculation (Tondini *et al.* 2020 ; Conacher *et al.* 2022).

Il serait par ailleurs intéressant d'observer la composition des floccs au microscope pour vérifier la présence de *T. delbrueckii* et confirmer son rôle dans ce phénotype. Cela permettrait également de déterminer si ces floccs sont mono-spécifiques ou résultent de co-floculation de cellules de plusieurs espèces, comme observée dans des co-cultures de *S. cerevisiae* et *H. opuntiae* (Rossouw *et al.* 2015).

Discussion générale

&

Perspectives

L'objectif de cette thèse était de construire un consortium de levures du vin comme outil microbiologique pour faciliter l'étude des communautés naturelles caractéristiques des moûts de raisin. Comme preuve de concept, le consortium a été appliqué dans une étude de l'effet de la diversité du consortium dans la réponse au stress osmotique.

Lors du développement de ce consortium, une première question concernait le choix des souches et des espèces à inclure de manière à représenter au mieux la diversité présente au sein de la communauté naturelle retrouvée en œnologie. Cette question a été abordée dans les deux premiers chapitres de cette thèse. Ainsi, nous avons tout d'abord mené une étude bibliographique afin de sélectionner des espèces fréquemment observées dans les moûts de raisin. Notre étude a mis en évidence une diversité relativement élevée d'espèces de levures, avec près de 140 espèces de levures retrouvées, en accord avec les ordres de grandeurs d'autres études similaires (Drumonde-Neves *et al.* 2021). Toutefois, à l'échelle d'une fermentation, le nombre d'espèces présentes dans le moût se limite à une dizaine, selon l'état de santé des baies et les pratiques vitivinicoles. Ainsi, nous avons restreint notre sélection initiale à sept espèces, parmi les plus communément trouvées dans les moûts ou pendant la fermentation, à savoir : *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Starmerella bacillaris*, *Pichia kudriavzevii*, *Lachancea thermotolerans*, *Torulaspora delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae*. *H. uvarum*, ainsi que *M. pulcherrima* dans une moindre mesure, qui sont retrouvées très fréquemment et en grande quantité dans les moûts. *S. bacillaris*, bien qu'un peu moins fréquente, est généralement présente en grand nombre. *P. kudriavzevii*, *T. delbrueckii* et *L. thermotolerans* sont généralement retrouvées en très faible proportion. *P. kudriavzevii* étant une des espèces les plus fréquentes du genre *Pichia* régulièrement trouvée dans les moûts. *S. cerevisiae* est rarement isolée sur le raisin, et en faible quantité dans les moûts, mais c'est elle qui réalise l'essentiel de la fermentation, après une croissance rapide en début de fermentation.

Les critères de sélection initiaux pour les souches choisies portaient sur leur origine à partir du moût de raisin et sur leur disponibilité sans restriction pour une utilisation au sein du consortium. Ainsi, la souche de *Saccharomyces cerevisiae* a été choisie en raison de son isolement et de sa caractérisation dans une étude antérieure (Legras *et al.* 2018). Pour les six espèces non-*Saccharomyces* étudiées dans ce travail, trois souches par espèces ont été sélectionnées, toutes isolées dans le sud de la France dans le cadre du projet *PeakYeast* mené

au sein du laboratoire SPO. L'utilisation de plusieurs souches de chaque espèce a été décidée en raison de la variabilité intraspécifique observée dans les phénotypes liés à la fermentation, tels que la production de métabolites, ainsi que dans les capacités de résistance aux stress comme l'éthanol ou le dioxyde de soufre (Capece *et al.* 2005 ; Camarasa *et al.* 2011 ; Hranilovic *et al.* 2018 ; Binati *et al.* 2019 ; Silva-Sousa *et al.* 2022). Nous avons, donc, dans un premier temps, testé l'impact de la souche dans des interactions deux à deux, dites « par paires ». Plus précisément, notre objectif était d'évaluer qui de l'espèce ou de la souche était déterminante dans les interactions. Nous avons, pour cela, mesuré la performance de co-cultures de 15 souches de 5 espèces différentes (*H. uvarum*, *S. bacillaris*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae*), chaque espèce étant représentée par 3 souches. Toutes les co-cultures ont été comparées sur la base de différents paramètres de croissance. Ce premier travail (Pourcelot *et al.* 2023) a confirmé l'impact prédominant du niveau de l'espèce dans les interactions, mettant par exemple en évidence des interactions négatives claires entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* ou *L. thermotolerans*. Celles-ci s'observent sur plusieurs paramètres de croissance, comme la croissance globale évaluée par l'aire sous la courbe, la population maximale et le taux de croissance. De plus, il semble que des co-cultures avec *S. bacillaris* présentent des interactions positives. Au vu de la diminution de proportion de *S. bacillaris* dans les co-cultures après 24h, et des résultats obtenus dans la suite de ce travail, montrant sa très rapide disparition dans les premières heures de la fermentation en consortia, nous pouvons supposer que les interactions positives observées résultent de l'écrasante croissance des autres espèces en co-culture, plus que d'une réelle interaction positive.

Malgré l'effet interspécifique majeur, en particulier sur le type d'interaction (positive ou négative), des variations intraspécifiques ont pu être observées dans les co-cultures, notamment sur l'intensité des interactions, c'est-à-dire l'écart relatif entre la co-culture et la moyenne des mono-cultures. Enfin, il est important de noter que nos conclusions se basent sur l'analyse de phénotypes très intégrés, en l'occurrence la croissance en biomasse totale. Ce phénotype résulte de la combinaison d'un très grand nombre de facteurs, certains pouvant se compenser. De plus, la croissance a été mesurée en microplaque en milieu synthétique, dont les conditions divergent donc fortement des conditions réelles. Il est également probable que des variations plus fines liées à des interactions puissent être détectées sur d'autres paramètres comme la production d'arômes.

Dans le chapitre 2, notre démarche a consisté à approfondir l'investigation de l'effet souche dans les interactions et à utiliser ces données pour guider la construction du consortium. Pour ce faire, nous avons évalué les performances des différentes souches dans le cadre de fermentation impliquant des consortia de sept espèces. Nous avons, ainsi, créé neuf consortia constitués d'une combinaison unique de souches tirées aléatoirement dans un pool composé de trois souches par espèces NS. Ces consortia ont été caractérisés pour différents phénotypes fermentaires et métaboliques. Nous avons alors montré que les variations intraspécifiques impactaient peu, dans la très grande majorité des cas, les phénotypes étudiés au niveau du consortium. Cela confirmant les premiers résultats observés, dans le chapitre 1, lors des expérimentations en co-cultures par paires. Au niveau du consortium, les seules signatures détectables de la variabilité des souches correspondaient à celle de *L. thermotolerans* et *M. pulcherima* pour la production d'acide lactique et de glycérol respectivement. Ces résultats peuvent s'expliquer d'une part par la compensation des caractéristiques de chacune des espèces ainsi que par l'envahissement rapide des consortia par *S. cerevisiae*. Les consortia présentaient d'ailleurs des phénotypes très proches les uns des autres. L'ensemble de ces résultats nous a conduit à sélectionner une composition unique de souche pour notre écosystème modèle (le consortium C4).

Les deux premiers chapitres de ce travail étaient, donc, dédiés au choix des espèces et des souches pour composer le consortium. Une fois la composition du consortium déterminée, nous nous sommes concentrés, dans le chapitre 3, sur les mises au point méthodologiques nécessaires à son développement. La stratégie choisie pour détecter chaque espèce fût celle d'un suivi des sous-populations par cytométrie en flux associée à l'utilisation de souches marquées avec des fluorochromes différents. Ceci dans l'optique d'un suivi facilité des différentes espèces pendant la fermentation. Pour cela, nous avons construit des souches modifiées génétiquement avec des gènes de protéines fluorescentes différents. Ce marquage a été réalisé par intégration ciblée du gène de protéine fluorescente par recombinaison homologue. La construction des souches, notamment des non-*Saccharomyces*, a été possible grâce à l'utilisation d'un protocole d'électroporation et l'utilisation de bras d'homologie d'1 kb qui étaient inclus dans des plasmides spécifiques construits par Gibson assembly. L'utilisation de bras d'homologie plus long est connue pour favoriser la recombinaison homologue, et a déjà permis la transformation de plusieurs non-

Saccharomyces (Nambu-Nishida *et al.* 2017 ; Badura *et al.* 2021). Nous avons ainsi réussi à obtenir des souches de *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *S. bacillaris*, *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* et *P. kudriavzevii*, chacune marquée avec un ou deux fluorochromes et pouvant constituer le consortium. L'intégration au locus n'a pas fonctionné pour *M. pulcherrima*, malgré les bras d'homologie d'1 kb. Toutefois, nous avons observé une bonne efficacité de la transformation, soulignant la possibilité de réaliser des transformations par intégration aléatoire. De précédentes études ont d'ailleurs déjà discuté de la possibilité d'utiliser l'intégration aléatoire ou des plasmides chez *M. pulcherrima* (Nigro *et al.* 1999 ; Gordon *et al.* 2019). Pour réussir l'intégration ciblée, il pourrait être intéressant de tester d'autres méthodes favorisant la recombinaison homologues. Il est par exemple possible d'utiliser des inhibiteurs de la voie NHEJ (Nambu-Nishida *et al.* 2017) : cependant, cela ne semble pas suffisant chez *M. pulcherrima* (Moreno-Beltrán *et al.* 2021). Une autre piste pourrait être l'utilisation du système CRISPR-Cas9 dans des complexes RNP (RiboNucleoProtein). Le principe est de transformer par électroporation en même temps un complexe avec la protéine Cas9 et son guide et le fragment à intégrer (Grahl *et al.* 2017 ; Seki et Rutz 2018). L'utilisation de l'enzyme Cas9 permet de favoriser l'intégration au locus, en créant une cassure double brin au locus ciblé. L'avantage du système RNP est qu'il ne nécessite pas de plasmide, et que la protéine Cas9 est présente de façon transitoire, limitant les cassures non-ciblées (Wang *et al.* 2017 ; Wang et Coleman 2019). Ce système a déjà été utilisé avec succès pour augmenter l'efficacité de l'intégration ciblée chez la levure, notamment des souches œnologiques de *B. bruxellensis* (Grahl *et al.* 2017 ; Varela *et al.* 2020).

Concernant le suivi par cytométrie, nos résultats montrent une bonne quantification des consortia grâce à l'utilisation de quatre fluorochromes. Ainsi, la stratégie utilisée permet de suivre les différentes sous-populations d'un consortium comportant jusqu'à six espèces, notamment en début de fermentation. Il faut toutefois noter que la quantification absolue des sous-populations n'est précise que pour des concentrations cellulaires supérieures à 10^6 cellules/mL. En dessous de ce seuil et en prenant en compte les effets de dilution, une quantification précise est plus difficile. Ainsi, cette stratégie pourrait être limitante pour la détection de sous-population en faible proportion. D'autres stratégies de suivi des populations pourraient être envisagées pour la détection de sous-populations en faible

quantité, comme des méthodes de biologie moléculaires telles que la PCR quantitative ou la PCR digitale (Nilsson *et al.* 2019 ; Cremonesi *et al.* 2022).

Dans la dernière partie de cette thèse, nous avons souhaité utiliser ce consortium pour répondre à des questions d'écologie microbienne. Nous nous sommes, ainsi, intéressés au lien entre diversité et robustesse d'un écosystème. En effet, il a été théorisé que plus un écosystème est divers et plus il est résistant à différents évènements de stress. Nous avons donc soumis à un stress osmotique, différents consortia, dérivés de notre écosystème modèle, et présentant des niveaux de diversité α variables. Chacun des écosystèmes était composé de cinq espèces. Les proportions initiales des levures NS variaient d'un écosystème à l'autre. Nous n'avons pas observé d'effet de la diversité α initiale sur la résistance au stress. Cette absence de résultat peut s'expliquer de trois façons. Tout d'abord le niveau de stress osmotique choisi dans notre étude n'était peut-être pas suffisamment élevé. Il se pourrait, en effet, que la différence de stress entre 200 g/L et 280 g/L de sucres initiaux n'ait pas été suffisamment marquée, d'autant plus que même 200 g/L représente déjà un niveau de stress significatif (Albertyn *et al.* 1994 ; Rossignol *et al.* 2003). Une autre façon d'expliquer nos résultats est liée à une gamme de diversité α relativement faible. Pour des raisons techniques, nous n'avons pas la possibilité de suivre autant de phénotypes chez un grand nombre d'écosystèmes et nous avons aussi fait le choix de garder une richesse spécifique fixe. Enfin, la dernière hypothèse tient au milieu utilisé. Celui-ci était synthétique et montrait donc une relative simplicité. Or, la théorie faisant le lien diversité/performance repose en grande partie sur la capacité d'un écosystème complexe d'exploiter toutes les sous-niches écologiques présentes dans un milieu (ensemble de ressources exploitées par une sous population, Hooper *et al.* 2005 ; Shade *et al.* 2012). Le moût de raisin étant relativement simple par rapport à des environnements naturels (sol, microbiote intestinal), d'autant plus dans le cas de fermentations en mout synthétique, ces sous-niches n'étaient peut-être pas présentes. Dans la même idée, il est aussi possible que toutes nos souches qui étaient d'origine œnologique exploitaient toutes les mêmes ressources. En revanche, bien que nous n'ayons pas montré un effet de la diversité α initiale, la composition en espèce a eu un effet sur la dynamique des différentes espèces et par conséquent la composition métabolique finale. Ce travail, bien que perfectible, à montrer l'utilité de notre écosystème modèle et doit être poursuivie selon deux axes complémentaires. Il faudrait, d'une part, multiplier les

écosystèmes pour non seulement obtenir une plus grande gamme de diversité initiale mais aussi pour séparer les différents effets comme la fréquence initiale de chacune des espèces et le niveau de diversité. D'autre part, il faudrait pouvoir suivre en cinétique de façon plus fine l'évolution des fréquences des espèces ainsi que la production/ consommation des différents métabolites (MCC, sources d'azotes, arômes, etc), afin d'identifier précisément le rôle de chaque espèce.

Enfin, l'ensemble de ce travail n'a pas montré un impact clair de la souche NS ou de la diversité microbienne sur les caractéristiques fermentaires. Ces résultats pouvant en partie s'expliquer par deux principaux facteurs limitants.

Le premier facteur relève du milieu utilisé. En effet, le moût synthétique a été choisi pour des raisons de facilité expérimentale durant cette phase de développement du consortium. Cependant, il est connu que les moûts naturels et même plus largement que les environnement réels (anthropiques ou sauvages) présentent une bien plus grande complexité et donc beaucoup plus de possibilités d'interactions complexes, notamment via l'existence de sous-niches écologiques que nous avons déjà évoquées. Il est donc indispensable maintenant que nous avons fait la preuve de l'utilité de notre consortium de le tester en moûts naturels. Le moût synthétique utilisé avait aussi comme particularité d'être riche en sources d'azote assimilable et en lipides (Gutiérrez *et al.* 2012 ; Ochando *et al.* 2017 ; Su *et al.* 2020 ; Girardi-Piva *et al.* 2022). Nous avons fait ce choix pour maximiser la longueur de la phase de croissance exponentielle durant laquelle la dynamique des populations est la plus complexe et intéressante. Il serait donc important d'explorer l'effet de la composition du moût synthétique sur les interactions levures-levures en faisant varier par exemple le ratio sucre/azote/lipide. On se retrouve cependant encore une fois face à deux voies d'exploration complémentaires : étudier des variations fines de composition dans des milieux contrôlés ou explorer l'effet de la complexité des moûts naturels, laquelle par définition ne peut être maîtrisée.

Le second facteur concerne la proximité des différentes souches étudiées. En effet, elles ont toutes été isolées d'environnements œnologiques et pour la majorité en Languedoc. Or, l'origine technologique et géographique sont d'importants facteurs responsables de la diversité génétique au sein d'une espèce (Hranilovic *et al.* 2017 ; Peter *et al.* 2018 ; Silva *et al.*

2022) et joue également un rôle majeur dans les propriétés des différentes souches de *S. cerevisiae* (Camarasa *et al.* 2011 ; Legras *et al.* 2018). L'influence du génotype sur la diversité phénotypique a également été observée pour certaines espèces NS (Hranilovic *et al.* 2018). Il est probable que le choix de souches de levures plus diverses aurait pu nous permettre d'obtenir des variations plus fortes.

Pour conclure, ce travail de doctorat a permis le développement d'un écosystème modèle œnologique, un outil de microbiologie qui sera rendu disponible à toute la communauté scientifique. En effet, l'ensemble des souches qui le composent est déposé au CIRM-Levure. Dans le même esprit de science ouverte, l'ensemble des données, des protocoles et des scripts seront eux aussi mis à disposition sur des archives ouvertes. Ce travail nous a aussi permis d'obtenir une bien meilleure compréhension des interactions levures-levures que nous avons résumé dans ce schéma final (Figure 12).

Plusieurs questions restent ouvertes après l'étude des résultats présentés ici. Nous n'avons en effet pas étudié le métabolisme secondaire de chacune des espèces. La production de métabolites secondaires étant fortement lié à la production d'arômes, son étude en contexte de communauté complexe, ainsi qu'en matrice réelle, est donc essentielle pour de futures applications en œnologie. De futurs travaux pourraient également chercher à augmenter la complexité de la communauté modèle de levures développée dans ce travail. Il serait particulièrement intéressant d'y intégrer des espèces de bactéries afin d'être encore plus représentatif de la communauté microbienne présente lors de la fermentation et de sa dynamique. Cela permettrait par ailleurs d'étudier les effets combinés des interactions bactérie-levure et levure-levure, et d'explorer leurs mécanismes. Enfin, le consortium de levure pourrait servir d'outil pour développer ensuite des modèles mathématiques permettant la prédiction du fonctionnement de fermentation.

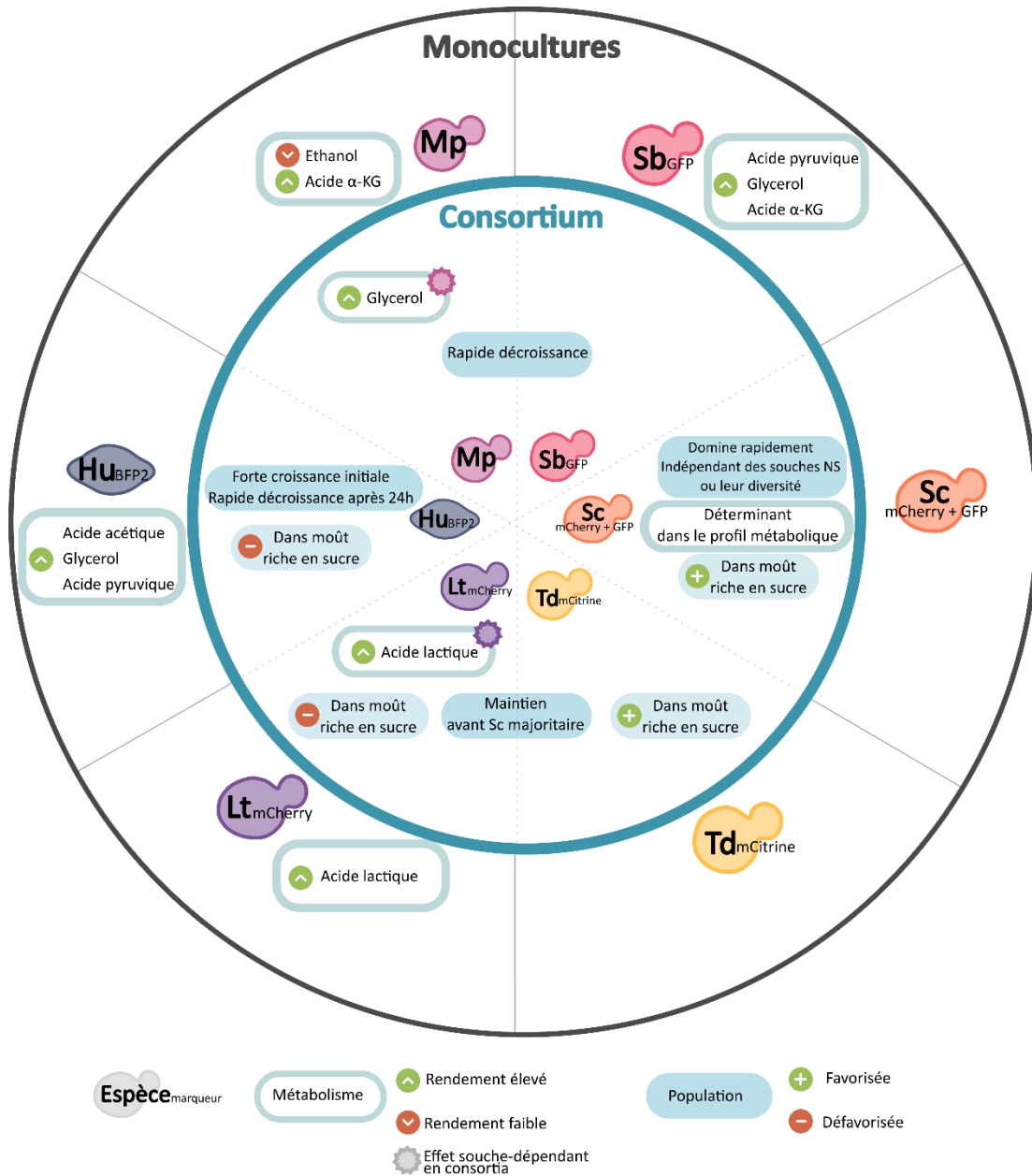


Figure 12 : Schéma récapitulant la composition du consortium, les propriétés remarquables de chaque espèce en mono-culture, ainsi que les informations sur leur dynamique dans le consortium. Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Lt: *Lachancea thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Sb: *Starmerella bacillaris*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Td: *Torulasporea delbrueckii*.

Annexes

Annexe 1 : Composition du moût synthétique (SGM425) à 200 g/L de sucres. Le moût synthétique est stocké à -20°C.

Composé	Quantité par litre	
Glucose	100	g
Fructose	100	g
Acide malique (DL)	6	g
Acide citrique monohydrate	6	g
Phosphate de potassium monobasique	0,75	g
Sulfate de potassium	0,5	g
Sulfate de magnésium heptahydrate	0,25	g
Chlorure de calcium dihydrate	0,155	g
Chlorure de sodium	0,2	g
Chlorure d'ammonium	0,46	g
Solution mère acides aminés (Annexe 2)	13,09	mL
Solution mère oligoéléments (Annexe 3)	1	mL
Solution mère vitamines (Annexe 4)	10	mL
Solution de travail de phytostérols (Annexe 5)	3,33	mL
Solution mère fer (Annexe 6)	1	mL
pH	3,3	
Eau osmosée	qsp 1085 g	

Annexe 2 : Composition de la solution stock d'acides aminés utilisée dans la préparation du moût synthétique. Cette solution est stockée à -20°C.

Composé	Concentration (g/L)
NaHCO ₃	20
Tyrosyne	1,4
Tryptophane	13,7
Isoleucine	2,5
Acide Aspartique	3,4
Acide glutamique	9,2
Arginine	28,6
Leucine	3,7
Thréonine	5,8
Glycine	1,4
Glutamine	38,6
Alanine	11,1
Valine	3,4
Méthionine	2,4
Phénylalanine	2,9
Sérine	6
Histidine	2,5
Lysine	1,3
L- Cystéine	1
Proline	46,8

Annexe 3 : Composition de la solution mère d'oligo-éléments utilisée dans la préparation du moût synthétique. La solution est stockée à 4°C après filtration (0.22 µm).

Composé	Concentration (g/L)
MnSO ₄ , H ₂ O	4
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	4
CuSO ₄ , 5H ₂ O	1
KI	1
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,4
H ₃ BO ₃	1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	1

Annexe 4 : Composition de la solution de vitamine utilisée dans la préparation du moût synthétique. La solution de biotine et la solution mère de vitamines sont stockées à -20°C.

Composé	Quantité par L	
Myo-Inositol	2	g
Pantothénate de calcium	0.15	g
Thiamine, hydrochloride	0.025	g
Acide Nicotinique	0.2	g
Pyridoxine	0.025	g
Biotine (0,1 g/L)	3	mL

Annexe 5 : Compositions de la solution mère et de la solution de travail de phytostérols utilisée dans la préparation du moût synthétique. Les deux solutions sont stockées à 4°C à l'abri de la lumière. La solution mère est chauffée à 60°C avant dilution.

Composé	Solution mère (15 g/L)	
β-Sitostérol	1	g/L
Tween 80	50	mL
Ethanol absolu	qsp 100	mL
Composé	Solution de travail (1,5 g/L)	
Solution stock	25	mL
Ethanol absolu	qsp 250	mL

Annexe 6 : Composition de la solution mère de fer utilisée dans la préparation du moût synthétique.

Composé	Concentration (g/L)
Chlorure de fer (III), heptahydrate	20

Références bibliographiques

- AGARBATI A., L. CANONICO, M. CIANI et F. COMITINI, 2019 « The impact of fungicide treatments on yeast biota of Verdicchio and Montepulciano grape varieties » H. Gerós (dir.), *PLOS ONE*, 14, 6 : e0217385.
- ALBERGARIA H. et N. ARNEBORG, 2016 « Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 5 : 2035-2046.
- ALBERGARIA H., D. FRANCISCO, K. GORI, N. ARNEBORG et F. GÍRIO, 2010 « *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 3 : 965-972.
- ALBERTIN W., L. CHASSERIAUD, G. COMTE, A. PANFILI, A. DELCAMP, F. SALIN, P. MARULLO et M. BELY, 2014 « Winemaking and Bioprocesses Strongly Shaped the Genetic Diversity of the Ubiquitous Yeast *Torulaspora delbrueckii* » J. Schacherer (dir.), *PLoS ONE*, 9, 4 : e94246.
- ALBERTIN W., M.E. SETATI, C. MIOT-SERTIER, T.T. MOSTERT, B. COLONNA-CECCALDI, J. COULON, P. GIRARD, V. MOINE, M. PILLET, F. SALIN, M. BELY, B. DIVOL et I. MASNEUF-POMAREDE, 2015 « *Hanseniaspora uvarum* from Winemaking Environments Show Spatial and Temporal Genetic Clustering », *Frontiers in microbiology*, 6 : 1569.
- ALBERTIN W., A. ZIMMER, C. MIOT-SERTIER, M. BERNARD, J. COULON, V. MOINE, B. COLONNA-CECCALDI, M. BELY, P. MARULLO et I. MASNEUF-POMAREDE, 2017 « Combined effect of the *Saccharomyces cerevisiae* lag phase and the non-*Saccharomyces* consortium to enhance wine fruitiness and complexity », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 20 : 7603-7620.
- ALBERTYN J., S. HOHMANN et B.A. PRIOR', 1994 « GPD1, Which Encodes Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase, Is Essential for Growth under Osmotic Stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and Its Expression Is Regulated by the High-Osmolarity Glycerol Response Pathway », *MOL. CELL. BIOL.*, 14.
- ALEKSEEVA A.Y., A.E. GROENENBOOM, E.J. SMID et S.E. SCHOUSTRA, 2021 « Eco-Evolutionary Dynamics in Microbial Communities from Spontaneous Fermented Foods », *International journal of environmental research and public health*, 18, 19.
- ALONSO GONZÁLEZ P. et E. PARGA-DANS, 2020 « Natural wine: do consumers know what it is, and how natural it really is? », 251 : 119635.
- ANDORRA I., M. MONTEIRO, B. ESTEVE-ZARZOSO, H. ALBERGARIA et A. MAS, 2011 « Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization, flow cytometry and quantitative PCR », *Food Microbiology*, 28, 8 : 1483-1491.
- Anon, s. d. « Les chiffres du BIO Panorama 2022 », *Agence Bio*. site internet (<https://www.agencebio.org/vos-outils/les-chiffres-cles/>), consulté le 28 juin 2023.
- APHALO P.J., 2023 *ggpmisc: Miscellaneous Extensions to « ggplot2 »*.
- ARANDA-DÍAZ A., B. OBADIA, R. DODGE, T. THOMSEN, Z.F. HALLBERG, Z.T. GÜVENER, W.B. LUDINGTON et K.C. HUANG, 2020 « Bacterial interspecies interactions modulate pH-mediated antibiotic tolerance », *eLife*, 9.
- ARBEFEVILLE S., A. HARRIS et P. FERRIERI, 2017 « Comparison of sequencing the D2 region of the large subunit ribosomal RNA gene (MicroSEQ®) versus the internal transcribed spacer (ITS) regions using two public databases for identification of common and uncommon clinically relevant fungal species », *Journal of Microbiological Methods*, 140 : 40-46.
- ARROYO-LÓPEZ F.N., Z. SALVADÓ, J. TRONCHONI, J.M. GUILLAMÓN et A. QUEROL, 2010 « Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments », *Yeast*, 27.

- ARSLAN E., Z. ÇELİK et T. CABAROĞLU, 2018 « Effects of Pure and Mixed Autochthonous *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on Fermentation and Volatile Compounds of Narince Wines », *Foods*, 7, 9 : 147.
- AVRAMOVA M., A. CIBRARIO, E. PELTIER, M. COTON, E. COTON, J. SCHACHERER, G. SPANO, V. CAPOZZI, G. BLAIOTTA, F. SALIN, M. DOLS-LAFARGUE, P. GRBIN, C. CURTIN, W. ALBERTIN et I. MASNEUF-POMAREDE, 2018 « *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution », *Scientific reports*, 8, 1 : 4136.
- BADURA J., N. VAN WYK, S. BREZINA, I.S. PRETORIUS, D. RAUHUT, J. WENDLAND et C. WALLBRUNN, 2021 « Development of Genetic Modification Tools for *Hanseniaspora uvarum* », *International journal of molecular sciences*, 22, 4 : 1943.
- BAGFI M.A., C. DOS SANTOS BEZERRA, M. ARÉVALO-VILLENA, A. ISABEL BRIONES-PÉREZ, E. GOMES et R. DA SILVA, 2011 « Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard », *Annals of Microbiology*, 61, 1 : 75-78.
- BAGHERI B., F.F. BAUER, G. CARDINALI et M.E. SETATI, 2020 « Ecological interactions are a primary driver of population dynamics in wine yeast microbiota during fermentation », *Scientific reports*, 10, 1 : 4911.
- BAGHERI B., F.F. BAUER et M.E. SETATI, 2016 « The Diversity and Dynamics of Indigenous Yeast Communities in Grape Must from Vineyards Employing Different Agronomic Practices and their Influence on Wine Fermentation », *South African Journal of Enology and Viticulture*, 36, 2.
- BAGHERI B., F.F. BAUER et M.E. SETATI, 2017 « The Impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a Wine Yeast Consortium in Natural and Inoculated Fermentations », *Frontiers in microbiology*, 8 : 1988.
- BAGHERI B., P. ZAMBELLI, I. VIGENTINI, F.F. BAUER et M.E. SETATI, 2018 « Investigating the Effect of Selected Non-*Saccharomyces* Species on Wine Ecosystem Function and Major Volatiles », *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6 : 169.
- BAIREY E., E.D. KELSIC et R. KISHONY, 2016 « High-order species interactions shape ecosystem diversity », *Nature communications*, 7 : 12285.
- BANILAS G., G. SGOUROS et A. NISIOTOU, 2016 « Development of microsatellite markers for *Lachancea thermotolerans* typing and population structure of wine-associated isolates », *Microbiological research*, 193 : 1-10.
- BARATA A., M. MALFEITO-FERREIRA et V. LOUREIRO, 2012 « The microbial ecology of wine grape berries », *International Journal of Food Microbiology*, 153, 3 : 243-259.
- BARBOSA C., P. LAGE, M. ESTEVES, L. CHAMBEL, A. MENDES-FAIA et A. MENDES-FERREIRA, 2018 « Molecular and Phenotypic Characterization of *Metschnikowia pulcherrima* Strains from Douro Wine Region », *Fermentation*, 4, 1 : 8.
- BARDI L., C. COCITO et M. MARZONA, 1999 « *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids », *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1-2 : 133-140.
- BARTOWSKY E.J. et P.A. HENSCHKE, 2004 « The 'buttery' attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond », *International Journal of Food Microbiology*, 96, 3 : 235-252.
- BARTOWSKY E.J., P.J. COSTELLO et P.J. CHAMBERS, 2015 « Emerging trends in the application of malolactic fermentation: Emerging trends in MLF », *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21 : 663-669.
- BATAILLON M., A. RICO, J.-M. SABLAYROLLES, J.-M. SALMON et P. BARRE, 1996 « Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics », *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 2 : 145-150.
- BAUDIN A., O. OZIER-KALOGEROPOULOS, A. DENOUEL, F. LACROUTE et C. CULLIN, 1993 « A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae* », *Nucleic Acids Research*, 21, 14 : 3329-3330.
- BAUER F.F. et I.S. PRETORIUS, 2000 « Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency: How to Survive the Making of Wine - A Review », *South African Journal of Enology & Viticulture*, 21, 1.

- BAUER R. et L.M. DICKS, 2004 « Control of malolactic fermentation in wine. A review »,.
- BELDA I., E. NAVASCUÉS, D. MARQUINA, A. SANTOS, F. CALDERON et S. BENITO, 2015 « Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 4 : 1911-1922.
- BELY M., J.-M. SABLAYROLLES et P. BARRE, 1990 « Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions », *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70, 4 : 246-252.
- BELY M., P. STOECKLE, I. MASNEUF-POMARÈDE et D. DUBOURDIEU, 2008 « Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation », *International Journal of Food Microbiology*, 122, 3 : 312-320.
- BENGTSSON-PALME J., 2020 « Microbial model communities: To understand complexity, harness the power of simplicity »,.
- BENÍTEZ T., L. DEL CASTILLO, A. AGUILERA, J. CONDE et E. CERDÁOLMEDO, 1983 « Selection of Wine Yeasts for Growth and Fermentation in the Presence of Ethanol and Sucrose », *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 5 : 1429-1436.
- BENITO S., T. HOFMANN, M. LAIER, B. LOCHBÜHLER, A. SCHÜTTLER, K. EBERT, S. FRITSCH, J. RÖCKER et D. RAUHUT, 2015 « Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* », *European Food Research and Technology*, 241, 5 : 707-717.
- BINATI R.L., G. INNOCENTE, V. GATTO, A. CELEBRIN, M. POLO, G.E. FELIS et S. TORRIANI, 2019 « Exploring the diversity of a collection of native non-*Saccharomyces* yeasts to develop co-starter cultures for winemaking », *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 122 : 432-442.
- BINATI R.L., W.J.F. LEMOS JUNIOR, G. LUZZINI, D. SLAGHENAUF, M. UGLIANO et S. TORRIANI, 2020 « 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 », *International Journal of Food Microbiology*, 318 : 108470.
- BINOD G. C., 2023 « Flow Cytometry : Introduction, Principle, Applications, Limitations », *The Science Notes*. site internet (<https://thesciencenotes.com/flow-cytometry-introduction-principle-applications-limitations/>), consulté le 7 juillet 2023.
- BISSON L.F., 1999 « Stuck and Sluggish Fermentations », *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 1 : 107-119.
- BLASCHE S., Y. KIM, A.P. OLIVEIRA et K.R. PATIL, 2017 « Model microbial communities for ecosystems biology », *Current Opinion in Systems Biology*, 6 : 51-57.
- BOCK A., T.H. SPARKS, N. ESTRELLA et A. MENZEL, 2013 « Climate-Induced Changes in Grapevine Yield and Must Sugar Content in Franconia (Germany) between 1805 and 2010 » J. P. Hart (dir.), *PLoS ONE*, 8, 7 : e69015.
- BÖHMER M., D. SMOĽAK, K. ŽENIŠOVÁ, Z. ČAPLOVÁ, D. PANGALLO, A. PUŠKÁROVÁ, M. BUČKOVÁ, T. CABICAROVÁ, J. BUDIŠ, K. ŠOLTÝS, D. RUSŇÁKOVÁ, T. KUČTA et T. SZEMES, 2020 « Comparison of microbial diversity during two different wine fermentation processes », *FEMS Microbiology Letters*, 367, 18 : fnaa150.
- BOKULICH N.A., J.H. THORNGATE, P.M. RICHARDSON et D.A. MILLS, 2014 « Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 1 : 139-48.
- BORDET F., A. JORAN, G. KLEIN, C. ROULLIER-GALL et H. ALEXANDRE, 2020 « Yeast-Yeast Interactions: Mechanisms, Methodologies and Impact on Composition », *Microorganisms*, 8, 4.
- BOYNTON P.J., 2019 « The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats », *Yeast*, 36, 8 : 473-485.
- BOYNTON P.J. et D. GREIG, 2016 « Species richness influences wine ecosystem function through a dominant species », *Fungal Ecology*, 22 : 61-72.

- BRESLOW D.K., D.M. CAMERON, S.R. COLLINS, M. SCHULDINER, J. STEWART-ORNSTEIN, H.W. NEWMAN, S. BRAUN, H.D. MADHANI, N.J. KROGAN et J.S. WEISSMAN, 2008 « A comprehensive strategy enabling high-resolution functional analysis of the yeast genome », *Nature Methods*, 5, 8 : 711-718.
- BRÜCKNER S., R. SCHUBERT, T. KRAUSHAAR, R. HARTMANN, D. HOFFMANN, E. JELLI, K. DRESCHER, D.J. MÜLLER, L. OLIVER ESSEN et H.-U. MÖSCH, 2020 « Kin discrimination in social yeast is mediated by cell surface receptors of the Flo11 adhesin family », *eLife*, 9.
- BRUNS T.D., 2019 « The developing relationship between the study of fungal communities and community ecology theory », *Fungal Ecology*, 39 : 393-402.
- BRYSCH-HERZBERG M. et M. SEIDEL, 2015 « Yeast diversity on grapes in two German wine growing regions », *International Journal of Food Microbiology*, 214 : 137-144.
- CADEZ N. et M.T. SMITH, 2011 « Chapter 32 - *Hanseniaspora* Zikes (1912) ». in C. P. Kurtzman, J. W. Fell, et T. Boekhout (dir.): *The Yeasts (Fifth Edition)*. 421-434. London, Elsevier.
- CAI P., J. GAO et Y. ZHOU, 2019 « CRISPR-mediated genome editing in non-conventional yeasts for biotechnological applications », *Microbial Cell Factories*, 18, 1 : 63.
- CAILLET M.-M., C. CHARPENTIER et D. PERALDI, 2020 « Les nouveaux courants d'expression dans le vin », *Revue française d'oenologie*, 300.
- CAMARASA C., I. SANCHEZ, P. BRIAL, F. BIGEY et S. DEQUIN, 2011 « Phenotypic Landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation: Evidence for Origin-Dependent Metabolic Traits » S. Harris (dir.), *PLoS ONE*, 6, 9 : e25147.
- CANON F., M. MARIADASSOU, M.-B. MAILLARD, H. FALENTIN, S. PARAYRE, M.-N. MADEC, F. VALENCE, G. HENRY, V. LAROUTE, M.-L. DAVERAN-MINGOT, M. COCAIGN-BOUSQUET, A. THIERRY et V. GAGNAIRE, 2020 « Function-Driven Design of Lactic Acid Bacteria Co-cultures to Produce New Fermented Food Associating Milk and Lupin », *Frontiers in Microbiology*, 11 : 584163.
- CAPECE A., C. FIORE, A. MARAZ et P. ROMANO, 2005 « Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin », *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1 : 136-144.
- CAPECE A., R. ROMANIELLO, G. SIESTO et P. ROMANO, 2012 « Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian "heroic vine-growing area" », *Food microbiology*, 31, 2 : 159-66.
- CARBONETTO B., T. NIDELET, S. GUEZENEC, M. PEREZ, D. SEGOND et D. SICARD, 2020 « Interactions between *Kazachstania humilis* Yeast Species and Lactic Acid Bacteria in Sourdough », *Microorganisms*, 8, 2.
- CASTELLINI A., C. MAURACHER et S. TROIANO, 2017 « An overview of the biodynamic wine sector », *International Journal of Wine Research*, Volume 9 : 1-11.
- ÇELEBI UZKUÇ N.M., B. ŞİŞLI, M. AY, S.Ö. TOGAY, Y. KARAGÜL YÜCEER, A. BAYHAN et A. KIRCA TOKLUCU, 2020 « Effects of spontaneous fermentation on Karalahna and Cabernet Sauvignon young red wines: volatile compounds, sensory profiles and identification of autochthonous yeasts », *European Food Research and Technology*, 246, 1 : 81-92.
- CHAMBERLAIN S.A., J.L. BRONSTEIN et J.A. RUDGERS, 2014 « How context dependent are species interactions? », *Ecology Letters*.
- CHASSERIAUD L., J. COULON, P. MARULLO, W. ALBERTIN et M. BELY, 2018 « New oenological practice to promote non-*Saccharomyces* species of interest: saturating grape juice with carbon dioxide », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 8 : 3779-3791.
- CHERAITI N., S. GUEZENEC et J.-M. SALMON, 2005 « Redox Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in Mixed Culture under Enological Conditions », *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1 : 255-260.
- CHIDI B.S., F.F. BAUER et D. ROSSOUW, 2018 « Organic Acid Metabolism and the Impact of Fermentation Practices on Wine Acidity: A Review », *South African Journal of Enology and Viticulture*, 39, 2.
- CHU Y., M. LI, J. JIN, X. DONG, K. XU, L. JIN, Y. QIAO et H. Ji, 2023 « Advances in the Application of the Non-Conventional Yeast *Pichia kudriavzevii* in Food and Biotechnology Industries », *Journal of Fungi*, 9, 2 : 170.

- CIANI M., A. CAPECE, F. COMITINI, L. CANONICO, G. SIESTO et P. ROMANO, 2016a « Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation », *Frontiers in Microbiology*, 7 : 555.
- CIANI M. et F. COMITINI, 2015 « Yeast interactions in multi-starter wine fermentation », *Current Opinion in Food Science*, 1 : 1-6.
- CIANI M. et F. COMITINI, 2019 « Yeast Ecology of Wine Production ». in P. Romano, M. Ciani, et G. H. Fleet (dir.): *Yeasts in the Production of Wine*. 1-42. New York, NY, Springer New York.
- CIANI M., F. COMITINI, I. MANNAZZU et P. DOMIZIO, 2010 « Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking », *FEMS yeast research*, 10, 2 : 123-33.
- CIANI M. et F. MACCARELLI, 1998 « Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making », 14.
- CIANI M., P. MORALES, F. COMITINI, J. TRONCHONI, L. CANONICO, J.A. CURIEL, L. ORO, A.J. RODRIGUES et R. GONZALEZ, 2016b « Non-conventional Yeast Species for Lowering Ethanol Content of Wines », *Frontiers in Microbiology*, 7.
- CIANI M. et G. PICCIOTTI, 1995 « The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making », *Biotechnology Letters*, 17, 11 : 1247-1250.
- COMBINA M., A. ELÍA, L. MERCADO, C. CATANIA, A. GANGA et C. MARTINEZ, 2005 « Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina », *International Journal of Food Microbiology*, 99, 3 : 237-243.
- COMITINI F., M. GOBBI, P. DOMIZIO, C. ROMANI, L. LENCIONI, I. MANNAZZU et M. CIANI, 2011 « Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* », *Food Microbiology*, 28, 5 : 873-882.
- CONACHER C.G., 2021 « Exploring multispecies interactions between wine-associated yeasts ». Thèse Agricultural Sciences. Stellenbosch : Stellenbosch University 139 p.
- CONACHER C.G., R.K. NAIDOO-BLASSOPLES, D. ROSSOUW et F.F. BAUER, 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.
- CONACHER C.G., R.K. NAIDOO-BLASSOPLES, D. ROSSOUW et F.F. BAUER, 2021 « Exploring multispecies interactions between wine-associated yeasts ». 12: 5547-5562pp.
- CONACHER C.G., R.K. NAIDOO-BLASSOPLES, D. ROSSOUW et F.F. BAUER, 2022 « A Transcriptomic Analysis of Higher-Order Ecological Interactions in a Eukaryotic Model Microbial Ecosystem » S. G. Tringe (dir.), *mSphere*, 7, 6 : e00436-22.
- CONACHER C.G., D. ROSSOUW et F.F.B. BAUER, 2019 « Peer pressure: evolutionary responses to biotic pressures in wine yeasts », *FEMS yeast research*, 19, 7.
- CONTRERAS A., C. CURTIN et C. VARELA, 2015 « Yeast population dynamics reveal a potential 'collaboration' between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 4 : 1885-1895.
- COSTANIGRO M., C. APPLEBY et S.D. MENKE, 2014 « The wine headache: Consumer perceptions of sulfites and willingness to pay for non-sulfited wines », *Food Quality and Preference*, 31 : 81-89.
- CREMONESI P., C. GAROFALO, C. PICOZZI, B. CASTIGLIONI, N. MANGIERI, V. MILANOVIĆ, A. OSIMANI et L. AQUILANTI, 2022 « Development of quantitative real-time PCR and digital droplet-PCR assays for rapid and early detection of the spoilage yeasts *Saccharomycopsis fibuligera* and *Wickerhamomyces anomalus* in bread », *Food Microbiology*, 101 : 103894.
- CRÉPIN L., T. NIDELET, I. SANCHEZ, S. DEQUIN et C. CAMARASA, 2012 « Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases », *Applied and environmental microbiology*, 78, 22 : 8102-11.
- CROXATTO A., G. PROD'HOM et G. GREUB, 2012 « Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology », *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 2 : 380-407.

- CSOMA H., Z. KÁLLAI, Z. ANTUNOVICS, K. CZENTYE et M. SIPICZKI, 2020 « Vinification without *Saccharomyces*: Interacting Osmotolerant and “Spoilage” Yeast Communities in Fermenting and Ageing Botrytised High-Sugar Wines (Tokaj Essence) », *Microorganisms*, 9, 1 : 19.
- CUIJVERS K., S. VAN DEN HEUVEL, C. VARELA, M. RULLO, M. SOLOMON, S. SCHMIDT et A. BORNEMAN, 2020 « Alterations in Yeast Species Composition of Uninoculated Wine Ferments by the Addition of Sulphur Dioxide », *Fermentation*, 6, 2 : 62.
- CURTIS T. et W. SLOAN, 2004 « Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology », *Current Opinion in Microbiology*, 7, 3 : 221-226.
- D’AMICO M., G. DI VITA et L. MONACO, 2016 « Exploring environmental consciousness and consumer preferences for organic wines without sulfites », *Journal of Cleaner Production*, 120 : 64-71.
- DE BELLIS D., A. DI STEFANO, P. SIMEONE, G. CATITTI, S. VESPA, A. PATRUNO, M. MARCHISIO, E. MARI, L. GRANCHI, C. VITI, P. CHIACCHIARETTA, A. CICHELLI, R. TOFALO et P. LANUTI, 2022 « Rapid Detection of *Brettanomyces bruxellensis* in Wine by Polychromatic Flow Cytometry », *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 23 : 15091.
- DE GUIDI I., V. FARINES, J.-L. LEGRAS et B. BLONDIN, 2021 « Development of a New Assay for Measuring H₂S Production during Alcoholic Fermentation: Application to the Evaluation of the Main Factors Impacting H₂S Production by Three *Saccharomyces cerevisiae* Wine Strains », *Fermentation*, 7, 4 : 213.
- DE ROY K., M. MARZORATI, P. VAN DEN ABEELE, T. VAN DE WIELE et N. BOON, 2014 « Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities: Synthetic microbial ecosystems », *Environmental Microbiology*, 16, 6 : 1472-1481.
- DEL MÓNACO S.M., N.B. BARDA, N.C. RUBIO et A.C. CABALLERO, 2014 « Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification », *Journal of applied microbiology*, 117, 2 : 451-64.
- DEMUYTER C., M. LOLLIER, J.-L. LEGRAS et C. LE JEUNE, 2004 « Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery », *Journal of Applied Microbiology*, 97, 6 : 1140-1148.
- DENEULIN P. et X. DUPRAZ, 2018 « Vins sans sulfites ajoutés et labels environnementaux : quel prix pour les consommateurs suisses? », *Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 48.
- DEQUIN S., J.-L. ESCUDIER, M. BELY, J. NOBLE, W. ALBERTIN, I. MASNEUF-POMARÈDE, P. MARULLO, J.-M. SALMON et J.M. SABLAYROLLES, 2017 « How to adapt winemaking practices to modified grape composition under climate change conditions », *OENO One*, 51, 2 : 205.
- DEROITE A., J.-L. LEGRAS, P. RIGOU, A. ORTIZ-JULIEN et S. DEQUIN, 2018 « Lipids modulate acetic acid and thiol final concentrations in wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids », *AMB Express*, 8, 1 : 130.
- DEROOVER K., M. SIEGRIST, K. BRAIN, J. MCINTYRE et T. BUCHER, 2021 « A scoping review on consumer behaviour related to wine and health », *Trends in Food Science & Technology*, 112 : 559-580.
- DI LIU, P. ZHANG, D. CHEN et K. HOWELL, 2019 « From the Vineyard to the Winery: How Microbial Ecology Drives Regional Distinctiveness of Wine », *Frontiers in microbiology*, 10 : 2679.
- DI MAIO S., G. GENNA, V. GANDOLFO, G. AMORE, M. CIACCIO et D. OLIVA, 2016 « Presence of *Candida zemplinina* in Sicilian Musts and Selection of a Strain for Wine Mixed Fermentations », *South African Journal of Enology & Viticulture*, 33, 1.
- DI MARO E., D. ERCOLINI et S. COPPOLA, 2007 « Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape », *International Journal of Food Microbiology*, 117, 2 : 201-210.
- DÍAZ C., A.M. MOLINA, J. NÄHRING et R. FISCHER, 2013 « Characterization and dynamic behavior of wild yeast during spontaneous wine fermentation in steel tanks and amphorae », *BioMed research international*, 2013 : 540465.
- DIMUCCI D., M. KON et D. SEGRÈ, 2018 « Machine Learning Reveals Missing Edges and Putative Interaction Mechanisms in Microbial Ecosystem Networks », *mSystems*, 3, 5.

- DOLINŠEK J., F. GOLDSCHMIDT et D.R. JOHNSON, 2016 « Synthetic microbial ecology and the dynamic interplay between microbial genotypes » J. R. Van Der Meer (dir.), *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 6 : 961-979.
- DOMIZIO P., Y. LIU, L.F. BISSON et D. BARILE, 2014 « Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine », *Food Microbiology*, 43 : 5-15.
- DOUGLASS A.P., B. OFFEL, S. BRAUN-GALLEANI, A.Y. COUGHLAN, A.A.R. MARTOS, R.A. ORTIZ-MERINO, K.P. BYRNE et K.H. WOLFE, 2018 « Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names » A. P. Mitchell (dir.), *PLOS Pathogens*, 14, 7 : e1007138.
- DRUMONDE-NEVES J., T. FERNANDES, T. LIMA, C. PAIS et R. FRANCO-DUARTE, 2021 « Learning from 80 years of studies: a comprehensive catalogue of non-*Saccharomyces* yeasts associated with viticulture and winemaking », *FEMS yeast research*, 21, 3 : foab017.
- DRUMONDE-NEVES J., R. FRANCO-DUARTE, T. LIMA, D. SCHULLER et C. PAIS, 2017 « Association between Grape Yeast Communities and the Vineyard Ecosystems », *PLoS one*, 12, 1 : 0169883.
- DUCHÈNE E. et C. SCHNEIDER, 2005 « Grapevine and climatic changes: a glance at the situation in Alsace », *Agronomy for Sustainable Development*, 25, 1 : 93-99.
- DUJON B., 2010 « Yeast evolutionary genomics », *Nature reviews. Genetics*, 11, 7 : 512-24.
- EL RAYESS Y. et M. MIETTON-PEUCHOT, 2016 « Membrane Technologies in Wine Industry: An Overview », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 12 : 2005-2020
- ENGLEZOS V., L. COCOLIN, K. RANTSIOU, A. ORTIZ-JULIEN, A. BLOEM, S. DEQUIN et C. CAMARASA, 2018 « Specific Phenotypic Traits of *Starmerella bacillaris* Related to Nitrogen Source Consumption and Central Carbon Metabolite Production during Wine Fermentation », *Applied and environmental microbiology*, 84, 16.
- ENGLEZOS V., L. COCOLIN, K. RANTSIOU, A. ORTIZ-JULIEN, A. BLOEM, P. SEGUINOT et C. CAMARASA, 2020 « Influence of single nitrogen compounds on growth and fermentation performance of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation », *Applied and environmental microbiology*.
- ENGLEZOS V., S. GIACOSA, K. RANTSIOU, L. ROLLE et L. COCOLIN, 2017 « *Starmerella bacillaris* in winemaking: opportunities and risks », *Current Opinion in Food Science*, 17 : 30-35.
- ENGLEZOS V., K. RANTSIOU, S. GIACOSA, S. RÍO SEGADE, L. ROLLE et L. COCOLIN, 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.
- ENGLEZOS V., K. RANTSIOU, F. TORCHIO, L. ROLLE, V. GERBI et L. COCOLIN, 2015 « Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: physiological and molecular characterizations », *International Journal of Food Microbiology*, 199 : 33-40.
- ENGS R.C., 1995 « Do Traditional Western European Drinking Practices Have Origins in Antiquity? », *Addiction Research*, 2, 3 : 227-239.
- ESCALERA-FANJUL X., H. QUEZADA, L. RIEGO-RUIZ et A. GONZÁLEZ, 2019 « Whole-Genome Duplication and Yeast's Fruitful Way of Life », *Trends in Genetics*, 35, 1 : 42-54.
- ESTEVE-ZARZOSO B., 1999 « Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers », *International Journal of Systematic Bacteriology* : 9.
- EVERS M.S., L. RAMOUSSE, C. MORGE, C. SPARROW, A. GOBERT, C. ROULLIER-GALL et H. ALEXANDRE, 2023 « To each their own: Delving into the vitaminic preferences of non-*Saccharomyces* wine yeasts », *Food Microbiology*, 115 : 104332.
- EVERS M.S., C. ROULLIER-GALL, C. MORGE, C. SPARROW, A. GOBERT et H. ALEXANDRE, 2021 « Vitamins in wine: Which, what for, and how much? », *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 20, 3 : 2991-3035.
- FABBRIZZI S., V. ALAMPI SOTTINI, M. CIPOLLARO et S. MENGHINI, 2021 « Sustainability and Natural Wines: An Exploratory Analysis on Consumers », *Sustainability*, 13, 14 : 7645.

- FAUST K. et J. RAES, 2012 « Microbial interactions: from networks to models », *Nature reviews. Microbiology*, 10, 8 : 538-50.
- FERREIRA J., M.D. TOIT et W.J.D. TOIT, 2006 « The effects of copper and high sugar concentrations on growth, fermentation efficiency and volatile acidity production of different commercial wine yeast strains », *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 1 : 50-56.
- FLEET G., 2003 « Yeast interactions and wine flavour », *International Journal of Food Microbiology*, 86, 1-2 : 11-22.
- FLEET G.H., 1993 *Wine Microbiology and Biotechnology*. CRC Press.
- FOSTER K.R. et T. BELL, 2012 « Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species », *Current biology : CB*, 22, 19 : 1845-50.
- FRAGA H., J.A. SANTOS, A.C. MALHEIRO, A.A. OLIVEIRA, J. MOUTINHO-PEREIRA et G.V. JONES, 2016 « Climatic suitability of Portuguese grapevine varieties and climate change adaptation: PORTUGUESE GRAPEVINE VARIETIES UNDER CLIMATE CHANGE », *International Journal of Climatology*, 36, 1 : 1-12.
- FRIEDMAN J., L.M. HIGGINS et J. GORE, 2017 « Community structure follows simple assembly rules in microbial microcosms », *Nature ecology & evolution*, 1, 5 : 109.
- FURUKAWA S., T. WATANABE, H. TOYAMA et Y. MORINAGA, 2013 « Significance of microbial symbiotic coexistence in traditional fermentation », *Journal of bioscience and bioengineering*, 116, 5 : 533-9.
- GALATI A., G. SCHIFANI, M. CRESCIMANNO et G. MIGLIORE, 2019 « “Natural wine” consumers and interest in label information: An analysis of willingness to pay in a new Italian wine market segment », *Journal of Cleaner Production*, 227 : 405-413.
- GAMBETTA G.A. et S.K. KURTURAL, 2021 « Global warming and wine quality: are we close to the tipping point? », *OENO One*, 55, 3 : 353-361.
- GAO C.-H., H. CAO, P. CAI et S.J. SØRENSEN, 2021 « The initial inoculation ratio regulates bacterial coculture interactions and metabolic capacity », *The ISME journal*, 15, 1 : 29-40.
- GATTO V., R.L. BINATI, W.J.F. LEMOS JUNIOR, A. BASILE, L. TREU, O.G.G. ALMEIDA, G. INNOCENTE, S. CAMPANARO et S. TORRIANI, 2020 « New insights into the variability of lactic acid production in *Lachancea thermotolerans* at the phenotypic and genomic level », *Microbiological research*, 238 : 126525.
- GHOSH S., B. BAGHERI, H.H. MORGAN, B. DIVOL et M.E. SETATI, 2015 « Assessment of wine microbial diversity using ARISA and cultivation-based methods », *Annals of Microbiology*, 65, 4 : 1833-1840.
- GIANVITO P.D., V. ENGLEZOS, K. RANTSIOU et L. COCOLIN, 2022 « Bioprotection strategies in winemaking », *International Journal of Food Microbiology*, 364 : 109532.
- GIRARDI-PIVA G., E. CASALTA, J.-L. LEGRAS, T. NIDELET, M. PRADAL, F. MACNA, D. FERREIRA, A. ORTIZ-JULIEN, C. TESNIÈRE, V. GALEOTE et J.-R. MOURET, 2022 « Influence of ergosterol and phytosterols on wine alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* strains », *Frontiers in Microbiology*, 13 : 966245.
- GIRI S., L. OÑA, S. WASCHINA, S. SHITUT, G. YOUSIF, C. KALETA et C. KOST, 2021 « Metabolic dissimilarity determines the establishment of cross-feeding interactions in bacteria », *Current biology : CB*, 31, 24 : 5547-55576.
- GOBBI M., F. COMITINI, P. DOMIZIO, C. ROMANI, L. LENCIONI, I. MANNAZZU et M. CIANI, 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 : 271-81.
- GOBERT A., R. TOURDOT-MARÉCHAL, C. MORGE, C. SPARROW, Y. LIU, B. QUINTANILLA-CASAS, S. VICHI et H. ALEXANDRE, 2017 « Non-*Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences: Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile », *Frontiers in Microbiology*, 8 : 2175.
- GOBERT A., R. TOURDOT-MARÉCHAL, C. SPARROW, C. MORGE et H. ALEXANDRE, 2019 « Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation », *Food Microbiology*, 83 : 71-85.

- GONÇALVES C., J.H. WISECAVER, J. KOMINEK, M.S. OOM, M.J. LEANDRO, X.-X. SHEN, D.A. OPULENTE, X. ZHOU, D. PERIS, C.P. KURTZMAN, C.T. HITTINGER, A. ROKAS et P. GONÇALVES, 2018 « Evidence for loss and reacquisition of alcoholic fermentation in a fructophilic yeast lineage », *eLife*, 7 : e33034.
- GONZÁLEZ-ALONSO I., M.E. WALKER, M.-E. VALLEJO-PASCUAL, G. NAHARRO-CARRASCO et V. JIRANEK, 2021 « Capturing yeast associated with grapes and spontaneous fermentations of the Negro Saurí minority variety from an experimental vineyard near León », *Scientific reports*, 11, 1 : 3748.
- GONZÁLEZ-ARENZANA L., P. GARIJO, C. BERLANAS, I. LÓPEZ-ALFARO, R. LÓPEZ, P. SANTAMARÍA et A.R. GUTIÉRREZ, 2017 « Genetic and phenotypic intraspecific variability of non- *Saccharomyces* yeasts populations from La Rioja winegrowing region (Spain) », *Journal of Applied Microbiology*, 122, 2 : 378-388.
- GONZÁLEZ-ROYO E., O. PASCUAL, N. KONTOUDAKIS, M. ESTERUELAS, B. ESTEVE-ZARZOSO, A. MAS, J.M. CANALS et F. ZAMORA, 2015 « Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production », *European Food Research and Technology*, 240, 5 : 999-1012.
- GORDON Z.B., M.P.M. SOLTYSIAK, C. LEICHTHAMMER, J.A. THERRIEN, R.S. MEANEY, C. LAUZON, M. ADAMS, D.K. LEE, P. JANAKIRAMA, M.-A. LACHANCE et B.J. KARAS, 2019 « Development of a Transformation Method for *Metschnikowia borealis* and other CUG-Serine Yeasts », *Genes*, 10, 2.
- GRAHL N., E.G. DEMERS, A.W. CROCKER et D.A. HOGAN, 2017 « Use of RNA-Protein Complexes for Genome Editing in Non-*albicans Candida* Species », *mSphere*, 2, 3.
- GRANGETEAU C., C. ROULLIER-GALL, S. ROUSSEAU, R.D. GOUGEON, P. SCHMITT-KOPPLIN, H. ALEXANDRE et M. GUILLOUX-BENATIER, 2017 « Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors », *Microbial biotechnology*, 10, 2 : 354-370.
- GROßKOPF T. et O.S. SOYER, 2014 « Synthetic microbial communities », *Current Opinion in Microbiology*, 18 : 72-77.
- GUARAGNELLA N., M. CHIARA, A. CAPECE, P. ROMANO, R. PIETRAFESA, G. SIESTO, C. MANZARI et G. PESOLE, 2019 « Genome Sequencing and Comparative Analysis of Three *Hanseniaspora uvarum* Indigenous Wine Strains Reveal Remarkable Biotechnological Potential », *Frontiers in microbiology*, 10 : 3133.
- GÜLDENER U., S. HECK, T. FIEDLER, J. BEINHAEUER et J.H. HEGEMANN, 1996 « A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast », *Nucleic Acids Research*, 24, 13 : 2519-2524.
- GUTIÉRREZ A., R. CHIVA, M. SANCHO, G. BELTRAN, F.N. ARROYO-LÓPEZ et J.M. GUILLAMON, 2012 « Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must », *Food Microbiology*, 31, 1 : 25-32.
- HANSEN M.C., R.J. PALMER, C. UDSSEN, D.C. WHITE et S. MOLIN, 2001 « Assessment of GFP fluorescence in cells of *Streptococcus gordonii* under conditions of low pH and low oxygen concentration », *Microbiology (Reading, England)*, 147, Pt 5 : 1383-1391.
- HARLÉ O., J. LEGRAND, C. TESNIÈRE, M. PRADAL, J.-R. MOURET et T. NIDELET, 2020 « Investigations of the mechanisms of interactions between four non-conventional species with *Saccharomyces cerevisiae* in oenological conditions » Y. Ohya (dir.), *PLOS ONE*, 15, 5 : e0233285.
- HARROUARD J., C. EBERLEIN, P. BALLESTRA, M. DOLS-LAFARGUE, I. MASNEUF-POMAREDE, C. MIOT-SERTIER, J. SCHACHERER, W. ALBERTIN et J. ROPARS, 2022 « *Brettanomyces bruxellensis* : Overview of the genetic and phenotypic diversity of an anthropized yeast », *Molecular Ecology* : mec.16439.
- HEARD G.M. et G.H. FLEET, 1988 « The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice », *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 1 : 23-28.
- HELTON J.C. et F.J. DAVIS, 2003 « Latin hypercube sampling and the propagation of uncertainty in analyses of complex systems », *Reliability Engineering & System Safety*, 81, 1 : 23-69.
- HENSCHKE P.A. et V. JIRANEK, 1993 « Yeasts-metabolism of nitrogen compounds ». in *Wine microbiology and biotechnology*. 163. Harwood Academic Publishers Chur, Switzerland.

- HERNANDEZ-LOPEZ M.J., J.A. PRIETO et F. RANDEZ-GIL, 2003 « Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains », *Antonie van Leeuwenhoek*, 84 : 125-134.
- HIERRO N., B. ESTEVE-ZARZOSO, A. MAS et J.M. GUILLAMÓN, 2007 « Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR », *FEMS yeast research*, 7, 8 : 1340-9.
- HIERRO N., A. GONZÁLEZ, A. MAS et J.M. GUILLAMÓN, 2006 « Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration », *FEMS Yeast Research*, 6, 1 : 102-111.
- HOEK T.A., K. AXELROD, T. BIANCALANI, E.A. YURTSEV, J. LIU et J. GORE, 2016 « Resource Availability Modulates the Cooperative and Competitive Nature of a Microbial Cross-Feeding Mutualism » N. Balaban (dir.), *PLOS Biology*, 14, 8 : e1002540.
- HOHMANN S., 2009 « Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* », *FEBS Letters*, 583, 24 : 4025-4029.
- HOLLISTER E.B., C. GAO et J. VERSALOVIC, 2014 « Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health », *Gastroenterology*, 146, 6 : 1449-1458.
- HOLM HANSEN E., P. NISSEN, P. SOMMER, J.C. NIELSEN et N. ARNEBORG, 2001 « The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae* », *Journal of Applied Microbiology*, 91, 3 : 541-547.
- HOOPER D., F. CHAPIN, J. EWEL, A. HECTOR, P. INCHAUSTI, S. LAVOREL, J. LAWTON, D. LODGE, M. LOREAU, S. NAEEM, B. SCHMID, H. SETÄLÄ, A. SYMSTAD, J. VANDERMEER et D. WARDLE, 2005 « EFFECTS OF BIODIVERSITY ON ECOSYSTEM FUNCTIONING: A CONSENSUS OF CURRENT KNOWLEDGE », *Ecol Monogr*, 75, 1 : 3-35.
- HraniLOVIC A., M. BELY, I. MASNEUF-POMAREDE, V. JIRANEK et W. ALBERTIN, 2017 « The evolution of *Lachancea thermotolerans* is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems », *PloS one*, 12, 9 : 0184652.
- HraniLOVIC A., J.M. GAMBETTA, L. SCHMIDTKE, P.K. BOSS, P.R. GRBIN, I. MASNEUF-POMAREDE, M. BELY, W. ALBERTIN et V. JIRANEK, 2018 « Oenological traits of *Lachancea thermotolerans* show signs of domestication and allopatric differentiation », *Scientific reports*, 8, 1 : 14812.
- ITAB, 2015 « Résultats de l'enquête Nationale sur les pratiques et les besoins œnologiques en Bio 2014 », site internet ([https://www.infowine.com/fr/nouvelles/r%C3%A9sultats de l'enqu%C3%AAte nationale sur les pratiques et les besoins %C5%93nologiques en bio 2014 sc 12962.htm](https://www.infowine.com/fr/nouvelles/r%C3%A9sultats%20de%20l%27enqu%C3%AAte%20nationale%20sur%20les%20pratiques%20et%20les%20besoins%20%C5%93nologiques%20en%20bio%202014%20sc%2012962.htm)), consulté le 29 juin 2023.
- IVEY M., M. MASSEL et T.G. PHISTER, 2013 « Microbial interactions in food fermentations », *Annual review of food science and technology*, 4 : 141-62.
- IVIT N.N., R. LONGO et B. KEMP, 2020 « The Effect of Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces Non-Cerevisiae* Yeasts on Ethanol and Glycerol Levels in Wine », *Fermentation*, 6, 3 : 77.
- JACOBSEN M.D., N.A.R. GOW, M.C.J. MAIDEN, D.J. SHAW et F.C. ODDS, 2007 « Strain Typing and Determination of Population Structure of *Candida krusei* by Multilocus Sequence Typing », *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 2 : 317-323.
- JARA C., V.F. LAURIE, A. MAS et J. ROMERO, 2016 « Microbial Terroir in Chilean Valleys: Diversity of Non-conventional Yeast », *Frontiers in microbiology*, 7 : 663.
- JOHNSON J., M. FU, M. QIAN, C. CURTIN et J.P. OSBORNE, 2020 « Influence of Select Non- *Saccharomyces* Yeast on *Hanseniaspora uvarum* Growth during Prefermentation Cold Maceration », *American Journal of Enology and Viticulture*, 71, 4 : 278-287.
- JOLLY N.P., O.P.H. AUGUSTYN et I.S. PRETORIUS, 2006 « Role and use of non-*Saccharomyces* in wine production », *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 1 : 15-39.
- JOLLY N.P., C. VARELA et I.S. PRETORIUS, 2014 « Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered », *FEMS yeast research*, 14, 2 : 215-37.

- JONES G.V., M.A. WHITE, O.R. COOPER et K. STORCHMANN, 2005 « Climate Change and Global Wine Quality », *Climatic Change*, 73, 3 : 319-343.
- KAPSOPOULOU K., A. KAPAKLIS et H. SPYROPOULOS, 2005 « Growth and Fermentation Characteristics of a Strain of the Wine Yeast *Kluyveromyces thermotolerans* Isolated in Greece », *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 8-9 : 1599-1602.
- KASSAMBARA A., 2023 *ggpubr: « ggplot2 » Based Publication Ready Plots*.
- KEHE J., A. KULESA, A. ORTIZ, C.M. ACKERMAN, S.G. THAKKU, D. SELLERS, S. KUEHN, J. GORE, J. FRIEDMAN et P.C. BLAINEY, 2019 « Massively parallel screening of synthetic microbial communities », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 26 : 12804-12809.
- KELLER M., 2010 « Managing grapevines to optimise fruit development in a challenging environment: a climate change primer for viticulturists », *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16 : 56-69.
- KEMSAWASD V., T. VIANA, Y. ARDÖ et N. ARNEBORG, 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.
- KLINNER U. et B. SCHÄFER, 2004 « Genetic aspects of targeted insertion mutagenesis in yeasts », *FEMS microbiology reviews*, 28, 2 : 201-23.
- KRASSOWSKI T., A.Y. COUGHLAN, X.-X. SHEN, X. ZHOU, J. KOMINEK, D.A. OPULENTE, R. RILEY, I.V. GRIGORIEV, N. MAHESHWARI, D.C. SHIELDS, C.P. KURTZMAN, C.T. HITTINGER, A. ROKAS et K.H. WOLFE, 2018 « Evolutionary instability of CUG-Leu in the genetic code of budding yeasts », *Nature Communications*, 9, 1 : 1887.
- KUNKEE R.E., 1984 « Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation », *Food Microbiology*, 1, 4 : 315-332.
- KUTYNA D.R., C. VARELA, P.A. HENSCHKE, P.J. CHAMBERS et G.A. STANLEY, 2010 « Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine », *Trends in Food Science & Technology*, 21, 6 : 293-302.
- KUZNETSOVA A., P.B. BROCKHOFF et R.H.B. CHRISTENSEN, 2017 « **ImerTest** Package: Tests in Linear Mixed Effects Models », *Journal of Statistical Software*, 82, 13.
- KYLILIS N., Z.A. TUZA, G.-B. STAN et K.M. POLIZZI, 2018 « Tools for engineering coordinated system behaviour in synthetic microbial consortia », *Nature Communications*, 9, 1 : 2677.
- LAGES F., M. SILVA-GRAÇA et C. LUCAS, 1999 « Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species », *Microbiology*, 145, 9 : 2577-2585.
- LAMBRECHTS M.G. et I.S. PRETORIUS, 2000 « Yeast and its importance to wine aroma-a review », *South african journal of enology and viticulture*, 21, 1 : 97-129.
- LANGENBERG A.-K., F.J. BINK, L. WOLFF, S. WALTER, C. VON WALLBRUNN, M. GROSSMANN, J.J. HEINISCH et H.-P. SCHMITZ, 2017 « Glycolytic Functions Are Conserved in the Genome of the Wine Yeast *Hanseniaspora uvarum*, and Pyruvate Kinase Limits Its Capacity for Alcoholic Fermentation » E. G. Dudley (dir.), *Applied and Environmental Microbiology*, 83, 22 : e01580-17.
- LEANDRO M.J., S. CABRAL, C. PRISTA, M.C. LOUREIRO-DIAS et H. SYCHROVÁ, 2014 « The High-Capacity Specific Fructose Facilitator ZrFfz1 Is Essential for the Fructophilic Behavior of *Zygosaccharomyces rouxii* CBS 732^T », *Eukaryotic Cell*, 13, 11 : 1371-1379.
- LEE S., W.A. LIM et K.S. THORN, 2013 « Improved blue, green, and red fluorescent protein tagging vectors for *S. cerevisiae* », *PLOS ONE*, 8, 7 : 67902.
- LEGRAS J.-L., V. GALEOTE, F. BIGEY, C. CAMARASA, S. MARSIT, T. NIDELET, I. SANCHEZ, A. COULOUX, J. GUY, R. FRANCO-DUARTE, M. MARCET-HOUBEN, T. GABALDON, D. SCHULLER, J.P. SAMPAIO et S. DEQUIN, 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.
- LEGRAS J.-L., D. MERDINOGLU, J.-M. CORNUET et F. KARST, 2007 « Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history », *Molecular Ecology*, 16, 10 : 2091-2102.

- LEMOS W.J., B. BOVO, C. NADAI, G. CROSATO, M. CARLOT, F. FAVARON, A. GIACOMINI et V. CORICH, 2016 « Biocontrol Ability and Action Mechanism of *Starmerella bacillaris* (Synonym *Candida zemplinina*) Isolated from Wine Musts against Gray Mold Disease Agent *Botrytis cinerea* on Grape and Their Effects on Alcoholic Fermentation », *Frontiers in Microbiology*, 7 : 1249.
- LEREBoullet A.-L., G. BELTRANDO et D.K. BARDSLEY, 2013 « Socio-ecological adaptation to climate change: A comparative case study from the Mediterranean wine industry in France and Australia », *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 164 : 273-285.
- LI E., A. LIU, B. XUE et Y. LIU, 2011 « Yeast species associated with spontaneous wine fermentation of Cabernet Sauvignon from Ningxia, China », *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 10 : 2475-2482.
- LI J., W. HU, X. HUANG et Y. XU, 2018 « Investigation of yeast population diversity and dynamics in spontaneous fermentation of Vidal blanc icewine by traditional culture-dependent and high-throughput sequencing methods », *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 112 : 66-77.
- LIGNON-DARMAILLAC S., 2014 « L'œnotourisme, redécouverte des valeurs patrimoniales des vignobles historiques, développement des vignobles du nouveau-monde ».
- Liti G., D.M. Carter, A.M. Moses, J. Warringer, L. Parts, S.A. James, R.P. Davey, I.N. Roberts, A. Burt, V. Koufopanou, I.J. Tsai, C.M. Bergman, D. Bensasson, M.J.T. O'Kelly, A. Van Oudenaarden, D.B.H. Barton, E. Bailes, A.N. Nguyen, M. Jones, M.A. Quail, I. Goodhead, S. Sims, F. Smith, A. Blomberg, R. Durbin et E.J. Louis, 2009 « Population genomics of domestic and wild yeasts », *Nature*, 458, 7236 : 337-341.
- LIU D., Q. CHEN, P. ZHANG, D. CHEN et K.S. HOWELL, 2020 « The Fungal Microbiome Is an Important Component of Vineyard Ecosystems and Correlates with Regional Distinctiveness of Wine » A. P. Mitchell (dir.), *mSphere*, 5, 4 : e00534-20.
- LLEIXÀ J., M. MANZANO, A. MAS et M.D.C. PORTILLO, 2016 « *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Competition during Microvinification under Different Sugar and Nitrogen Conditions », *Frontiers in Microbiology*, 7.
- LÖBS A.-K., C. SCHWARTZ et I. WHEELDON, 2017 « Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications », *Synthetic and systems biotechnology*, 2, 3 : 198-207.
- LOHSE M.B., M. GULATI, A.D. JOHNSON et C.J. NOBILE, 2018 « Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms », *Nature Reviews Microbiology*, 16, 1 : 19-31.
- LOIRA I., A. MORATA, M.A. BAÑUELOS et A. SUÁREZ-LEPE JOSÉ, 2020 « Isolation, Selection, and Identification Techniques for Non-*Saccharomyces* Yeasts of Oenological Interest ». in *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*. 467-508. Elsevier.
- LONGIN C., C. PETITGONNET, M. GUILLOUX-BENATIER, S. ROUSSEAU et H. ALEXANDRE, 2017 « Application of flow cytometry to wine microorganisms », *Food Microbiology*, 62 : 221-231.
- LONVAUD-FUNEL A., 1995 « Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects », *FEMS Microbiology Letters*, 126, 3 : 209-214.
- LUDINGTON W.B., 2022 « Higher-order microbiome interactions and how to find them », *Trends in Microbiology*, 30, 7 : 618-621.
- LUYT N.A., S. BEAUFORT, B. DIVOL, M.E. SETATI, P. TAILLANDIER et F.F. BAUER, 2021 « Phenotypic characterization of cell-to-cell interactions between two yeast species during alcoholic fermentation », *World journal of microbiology & biotechnology*, 37, 11 : 186.
- MA Q., J. ZHOU, W. ZHANG, X. MENG, J. SUN et Y. YUAN, 2011 « Integrated Proteomic and Metabolomic Analysis of an Artificial Microbial Community for Two-Step Production of Vitamin C » C. I. Lasmezas (dir.), *PLoS ONE*, 6, 10 : e26108.
- MACEY M.G., 2007 « Principles of flow cytometry », *Flow cytometry: Principles and applications* : 1-15.
- MAGYAR I., D. NYITRAI-SÁRDY, A. LESKÓ, A. POMÁZI et M. KÁLLAY, 2014 « Anaerobic organic acid metabolism of *Candida zemplinina* in comparison with *Saccharomyces* wine yeasts », *International Journal of Food Microbiology*, 178 : 1-6.

- MAGYAR I. et J. SOÓS, 2016 « Botrytized wines – current perspectives », *International Journal of Wine Research*, Volume 8 : 29-39.
- MALACRINÒ P., G. ZAPPAROLI, S. TORRIANI et F. DELLAGLIO, 2001 « Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry », *Journal of Microbiological Methods*, 45, 2 : 127-134.
- MANDAKOVIC D., R. PULGAR, J. MALDONADO, W. MARDONES, M. GONZÁLEZ, F.A. CUBILLOS et V. CAMBIAZO, 2020 « Fungal Diversity Analysis of Grape Musts from Central Valley-Chile and Characterization of Potential New Starter Cultures », *Microorganisms*, 8, 6 : 956.
- MARQUINA D., A. SANTOS et J. PEINADO, 2002 « Biology of killer yeasts », *International Microbiology*, 5, 2 : 65-71.
- MARSIT S. et S. DEQUIN, 2015 « Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review » J. Nielsen (dir.), *FEMS Yeast Research*, 15, 7 : fov067.
- MARTIN V., M. VALERA, K. MEDINA, E. BOIDO et F. CARRAU, 2018 « Oenological Impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* Yeast Genus on Wines—A Review », *Fermentation*, 4, 3 : 76.
- MARTÍNEZ P., A.C. CODÓN, L. PÉREZ et T. BENÍTEZ, 1995 « Physiological and molecular characterization of flor yeasts: Polymorphism of flor yeast populations », *Yeast*, 11, 14 : 1399-1411.
- MAS A. et M.C. PORTILLO, 2022 « Strategies for microbiological control of the alcoholic fermentation in wines by exploiting the microbial terroir complexity: A mini-review », *International Journal of Food Microbiology*, 367 : 109592.
- MASNEUF-POMAREDE I., M. BELY, P. MARULLO et W. ALBERTIN, 2016 « The Genetics of Non-conventional Wine Yeasts: Current Knowledge and Future Challenges », *Frontiers in Microbiology*, 6.
- MASNEUF-POMAREDE I., E. JUQUIN, C. MIOT-SERTIER, P. RENAULT, Y. LAIZET, F. SALIN, H. ALEXANDRE, V. CAPOZZI, L. COCOLIN, B. COLONNA-CECCALDI, V. ENGLEZOS, P. GIRARD, B. GONZALEZ, P. LUCAS, A. MAS, A. NISIOTOU, M. SIPCZKI, G. SPANO, C. TASSOU, M. BELY et W. ALBERTIN, 2015 « The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments », *FEMS yeast research*, 15, 5 : 045.
- MATEUS D., S. SOUSA, C. COIMBRA, F. S ROGERSON et J. SIMÕES, 2020 « Identification and Characterization of Non-*Saccharomyces* Species Isolated from Port Wine Spontaneous Fermentations », *Foods (Basel, Switzerland)*, 9, 2.
- MATURANO Y.P., M.V. MESTRE, B. ESTEVE-ZARZOSO, M.C. NALLY, M.C. LERENA, M.E. TORO, F. VAZQUEZ et M. COMBINA, 2015 « Yeast population dynamics during prefermentative cold soak of Cabernet Sauvignon and Malbec wines », *International Journal of Food Microbiology*, 199 : 23-32.
- MBUYANE L.L., F.F. BAUER, A. BLOEM, C. CAMARASA, A. ORTIZ-JULIEN et B. DIVOL, 2022 « Species-Dependent Metabolic Response to Lipid Mixtures in Wine Yeasts », *Frontiers in microbiology*, 13 : 823581.
- MBUYANE L.L., M. DE KOCK, F.F. BAUER et B. DIVOL, 2018 « *Torulaspota delbrueckii* produces high levels of C5 and C6 polyols during wine fermentations », *FEMS Yeast Research*, 18, 7.
- MCGOVERN P., M. JALABADZE, S. BATIUK, M.P. CALLAHAN, K.E. SMITH, G.R. HALL, E. KVAVADZE, D. MAGHRADZE, N. RUSISHVILI, L. BOUBY, O. FAILLA, G. COLA, L. MARIANI, E. BOARETTO, R. BACILIERI, P. THIS, N. WALES et D. LORDKIPANIDZE, 2017 « EARLY NEOLITHIC WINE OF GEORGIA IN THE SOUTH CAUCASUS », PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 114, 48..
- MEDINA K., E. BOIDO, E. DELLACASSA et F. CARRAU, 2012 « Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation », *International Journal of Food Microbiology*, 157, 2 : 245-50.
- MEE M.T., J.J. COLLINS, G.M. CHURCH et H.H. WANG, 2014 « Syntrophic exchange in synthetic microbial communities », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 20 : 2149-56.
- MENCHER A., P. MORALES, J.A. CUIEL, R. GONZALEZ et J. TRONCHONI, 2021 « *Metschnikowia pulcherrima* represses aerobic respiration in *Saccharomyces cerevisiae* suggesting a direct response to co-cultivation », *Food microbiology*, 94 : 103670.
- MENDIBURU F., 2010 « *Agricolae*: Statistical Procedures for Agricultural Research », *R package version*, 1 : 1-8.

- MENDOZA L.M., G.A. VEGA-LOPEZ, M. FERNÁNDEZ DE ULLIVARRI et R.R. RAYA, 2019 « Population and oenological characteristics of non-*Saccharomyces* yeasts associated with grapes of Northwestern Argentina », *Archives of Microbiology*, 201, 2 : 235-244.
- MILANOVIĆ V., F. COMITINI et M. CIANI, 2013 « Grape berry yeast communities: influence of fungicide treatments », *International Journal of Food Microbiology*, 161, 3 : 240-6.
- MILLS D.A., E.A. JOHANSEN et L. COCOLIN, 2002 « Yeast Diversity and Persistence in *Botrytis*-Affected Wine Fermentations », *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 10 : 4884-4893.
- MINTY J.J., M.E. SINGER, S.A. SCHOLZ, C.-H. BAE, J.-H. AHN, C.E. FOSTER, J.C. LIAO et X.N. LIN, 2013 « Design and characterization of synthetic fungal-bacterial consortia for direct production of isobutanol from cellulosic biomass », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 36 : 14592-7.
- MIRA DE ORDUÑA R., 2010 « Climate change associated effects on grape and wine quality and production », *Food Research International*, 43, 7 : 1844-1855.
- MITRI S. et K.R. FOSTER, 2013 « The Genotypic View of Social Interactions in Microbial Communities », *Annual Review of Genetics*, 47, 1 : 247-273.
- MODIG T., K. GRANATH, L. ADLER et G. LIDÉN, 2007 « Anaerobic glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae* strains under hyperosmotic stress », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 2 : 289-296.
- MOENNE M.I., P. SAA, V.F. LAURIE, J.R. PÉREZ-CORREA et E. AGOSIN, 2014 « Oxygen Incorporation and Dissolution During Industrial-Scale Red Wine Fermentations », *Food and Bioprocess Technology*, 7, 9 : 2627-2636.
- MORATA A., C. ESCOTT, I. LOIRA, J.M. DEL FRESNO, C. GONZÁLEZ et J.A. SUÁREZ-LEPE, 2019 « Influence of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Yeasts in the Formation of Pyranoanthocyanins and Polymeric Pigments during Red Wine Making », *Molecules*, 24, 24 : 4490.
- MORATA A., M.C. GÓMEZ-CORDOVÉS, B. COLOMO et J.A. SUÁREZ, 2003 « Pyruvic Acid and Acetaldehyde Production by Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae* : Relationship with Vitisin A and B Formation in Red Wines », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 25 : 7402-7409.
- MORATA A., I. LOIRA, W. TEFAYE, M. BAÑUELOS, C. GONZALEZ et J. SUAREZ LEPE, 2018 « *Lachancea thermotolerans* Applications in Wine Technology », *Fermentation*, 4, 3 : 53.
- MORENO-BELTRÁN M., D. GORE-LLOYD, C. CHUCK et D. HENK, 2021 « Variation among *Metschnikowia pulcherrima* Isolates for Genetic Modification and Homologous Recombination », *Microorganisms*, 9, 2 : 290.
- MORGAN S.C., G.C. MCCARTHY, B.S. WATTERS, M. TANTIKACHORNKIAT, I. ZIGG, M.A. CLIFF et D.M. DURALL, 2019 « Effect of sulfite addition and pied de cuve inoculation on the microbial communities and sensory profiles of Chardonnay wines: dominance of indigenous *Saccharomyces uvarum* at a commercial winery », *FEMS yeast research*, 19, 5.
- MORIN M., E.C. PIERCE et R.J. DUTTON, 2018 « Changes in the genetic requirements for microbial interactions with increasing community complexity », *eLife*, 7.
- MORRISON-WHITTLE P. et M.R. GODDARD, 2018 « From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation », *Environmental microbiology*, 20, 1 : 75-84.
- MOURET J.R., C. CAMARASA, M. ANGENIEUX, E. AGUERA, M. PEREZ, V. FARINES et J.M. SABLAYROLLES, 2014 « Kinetic analysis and gas-liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: Effect of assimilable nitrogen and temperature », *Food Research International*, 62 : 1-10.
- MOZELL M.R. et L. THACH, 2014 « The impact of climate change on the global wine industry: Challenges & solutions », *Wine Economics and Policy*, 3, 2 : 81-89.
- MÜHLHAUSEN S. et M. KOLLMAR, 2014 « Molecular Phylogeny of Sequenced *Saccharomycetes* Reveals Polyphyly of the Alternative Yeast Codon Usage », *Genome Biology and Evolution*, 6, 12 : 3222-3237.

- MUKHERJEE V., D. RADECKA, G. AERTS, K.J. VERSTREPEN, B. LIEVENS et J.M. THEVELEIN, 2017 « Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation », *Biotechnology for Biofuels*, 10, 1 : 216.
- NAMBU-NISHIDA Y., K. NISHIDA, T. HASUNUMA et A. KONDO, 2017 « Development of a comprehensive set of tools for genome engineering in a cold- and thermo-tolerant *Kluyveromyces marxianus* yeast strain », *Scientific reports*, 7, 1 : 8993.
- NAVARRETE C. et J. L. MARTÍNEZ, 2020 « Non-conventional yeasts as superior production platforms for sustainable fermentation based bio-manufacturing processes », *AIMS Bioengineering*, 7, 4 : 289-305.
- NAVRÁTILOVÁ M., M. BERANOVÁ, L. SEVEROVÁ, K. ŠRÉDL, R. SVOBODA et J. ABRHÁM, 2021 « The Impact of Climate Change on the Sugar Content of Grapes and the Sustainability of their Production in the Czech Republic », *Sustainability*, 13, 1 : 222.
- NICCOM B.A., E.K. KASTMAN, N. KFOURY, A. ROBBAT et B.E. WOLFE, 2020 « Strain-Level Diversity Impacts Cheese Rind Microbiome Assembly and Function » P. D. Cotter (dir.), *mSystems*, 5, 3 : e00149-20.
- NIDELET T., P. BRIAL, C. CAMARASA et S. DEQUIN, 2016 « Diversity of flux distribution in central carbon metabolism of *S. cerevisiae* strains from diverse environments », *Microbial cell factories*, 15 : 58.
- NIGRO F., M.M.F. SIALER et D. GALLITELLI, 1999 « TRANSFORMATION OF *METSCHNIKOWIA PULCHERRIMA* 320, BIOCONTROL AGENT OF STORAGE ROT, WITH THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN GENE », *Journal of Plant Pathology* : 4.
- NILSSON R.H., S. ANSLAN, M. BAHAM, C. WURZBACHER, P. BALDRIAN et L. TEDERSOO, 2019 « Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi », *Nature Reviews Microbiology*, 17, 2 : 95-109.
- NISIOTOU A.A., A.E. SPIROPOULOS et G.-J.E. NYCHAS, 2007 « Yeast community structures and dynamics in healthy and *Botrytis*-affected grape must fermentations », *Applied and environmental microbiology*, 73, 21 : 6705-13.
- NISSEN P., D. NIELSEN et N. ARNEBORG, 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.
- NOCKER A., M. BURR et A.K. CAMPER, 2007 « Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review », *Microbial Ecology*, 54, 2 : 276-289.
- OBEROI H.S., N. BABBAR, S.K. SANDHU, S.S. DHALIWAL, U. KAUR, B.S. CHADHA et V.K. BHARGAV, 2012 « Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1 », *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39, 4 : 557-566.
- OCHANDO T., J.-R. MOURET, A. HUMBERT-GOFFARD, J.-M. SABLAYROLLES et V. FARINES, 2017 « Impact of initial lipid content and oxygen supply on alcoholic fermentation in champagne-like musts », *Food Research International*, 98 : 87-94.
- OCÓN E., A.R. GUTIÉRREZ, P. GARIJO, C. TENORIO, I. LÓPEZ, R. LÓPEZ et P. SANTAMARÍA, 2010 « Quantitative and qualitative analysis of non-*Saccharomyces* yeasts in spontaneous alcoholic fermentations », *European Food Research and Technology*, 230, 6 : 885-891.
- OIV, 2022 « Note de conjoncture vitivinicole mondiale 2021 »,.
- OLÁHNÉ HORVÁTH B., D. NYITRAINÉ SÁRDY, N. KELLNER, I. MAGYAR, et SZENT ISTVÁN UNIVERSITY FACULTY OF HORTICULTURAL SCIENCE DEPARTMENT OF OENOLOGY, MÉNESI ÚT 45, 1118 BUDAPEST, HUNGARY, 2020 « Effects of the high sugar content on the fermentation dynamics and some metabolites of wine-related yeast species *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* and *Starmerella bacillaris* », *Food Technology and Biotechnology*, 58, 1 : 76-83.
- OLDENBURG K., 1997 « Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast », *Nucleic Acids Research*, 25, 2 : 451-452.

- ONETTO C.A., A.R. BORNEMAN et S.A. SCHMIDT, 2021 « Strain-Specific Responses by *Saccharomyces cerevisiae* to Competition by Non-*Saccharomyces* Yeasts », *Fermentation*, 7, 3 : 165.
- ORO L., M. CIANI et F. COMITINI, 2014 « Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts », *Journal of Applied Microbiology*, 116, 5 : 1209-1217.
- PADILLA B., D. GARCÍA-FERNÁNDEZ, B. GONZÁLEZ, I. IZIDORO, B. ESTEVE-ZARZOSO, G. BELTRAN et A. MAS, 2016 « Yeast Biodiversity from DOQ Priorat Uninoculated Fermentations », *Frontiers in microbiology*, 7 : 930.
- PATRIGNANI F., C. MONTANARI, D.I. SERRAZANETTI, G. BRASCHI, P. VERNOCCHI, G. TABANELLI, G.P. PARPINELLO, A. VERSARI, F. GARDINI et R. LANCIOTTI, 2017 « Characterisation of yeast microbiota, chemical and sensory properties of organic and biodynamic Sangiovese red wines », *Annals of Microbiology*, 67, 1 : 99-109.
- PENG B., T.C. WILLIAMS, M. HENRY, L.K. NIELSEN et C.E. VICKERS, 2015 « Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift: a comparison of yeast promoter activities », *Microbial cell factories*, 14 : 91.
- PEREIRA-CENCI T., D.M. DENG, E.A. KRANEVELD, E.M.M. MANDERS, A.A. DEL BEL CURY, J.M. TEN CATE et W. CRIELAARD, 2008 « The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces », *Archives of Oral Biology*, 53, 8 : 755-764.
- PETER J., M. DE CHIARA, A. FRIEDRICH, J.-X. YUE, D. PFLIEGER, A. BERGSTRÖM, A. SIGWALT, B. BARRE, K. FREEL, A. LLORED, C. CRUAUD, K. LABADIE, J.-M. AURY, B. ISTACE, K. LEBRIGAND, P. BARBRY, S. ENGELEN, A. LEMAINQUE, P. WINCKER, G. LITI et J. SCHACHERER, 2018 « Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates », *Nature*, 556, 7701 : 339-344.
- PETITGONNET C., G.L. KLEIN, C. ROULLIER-GALL, P. SCHMITT-KOPPLIN, B. QUINTANILLA-CASAS, S. VICHI, D. JULIEN-DAVID et H. ALEXANDRE, 2019 « Influence of cell-cell contact between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* on yeast interactions and the exo-metabolome », *Food microbiology*, 83 : 122-133.
- PFLIEGLER W.P., E. HORVÁTH, Z. KÁLLAI et M. SIPICZKI, 2014 « Diversity of *Candida zeylanoides* isolates inferred from RAPD, micro/mini-satellite and physiological analysis », *Microbiological research*, 169, 5-6 : 402-10.
- PICCARDI P., B. VESSMAN et S. MITRI, 2019 « Toxicity drives facilitation between 4 bacterial species », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 32 : 15979-15984.
- PIGEAU G.M. et D.L. INGLIS, 2005 « Upregulation of *ALD3* and *GPD1* in *Saccharomyces cerevisiae* during Icewine fermentation », *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1 : 112-125.
- POLIZZOTTO G., E. BARONE, G. PONTICELLO, T. FASCIANA, D. BARBERA, O. CORONA, G. AMORE, A. GIAMMANCO et D. OLIVA, 2016 « Isolation, identification and oenological characterization of non-*Saccharomyces* yeasts in a Mediterranean island », *Letters in applied microbiology*, 63, 2 : 131-8.
- PORTILLO M. del C. et A. MAS, 2016 « Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of Grenache grape variety by high-throughput barcoding sequencing », *LWT - Food Science and Technology*, 72 : 317-321.
- POURCELOT E., C. CONACHER, T. MARLIN, F. BAUER, V. GALEOTE et T. NIDELET, 2023 « Comparing the hierarchy of inter-and intraspecies interactions with population dynamics of wine yeast cocultures », *FEMS Yeast Research* : foad039.
- PRETORIUS I.S., 2000 « Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking », *Yeast*, 16, 8 : 675-729.
- PRIOR K.J., F.F. BAUER et B. DIVOL, 2019 « The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine », *Food microbiology*, 79 : 75-84.
- PUIG S. et J.E. PÉREZ-ORTÍN, 2000 « Expression Levels and Patterns of Glycolytic Yeast Genes During Wine Fermentation », *Systematic and Applied Microbiology*, 23, 2 : 300-303.
- QIAN J., J.E. CUTLER, R.B. COLE et Y. CAI, 2008 « MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 3 : 439-449.

- QUIRÓS M., V. ROJAS, R. GONZALEZ et P. MORALES, 2014 « Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration », *International Journal of Food Microbiology*, 181 : 85-91.
- R CORE TEAM, 2022 *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.
- R CORE TEAM, 2023 *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.
- RADLER F., M.J. SCHMITT et B. MEYER, 1990 « Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum* », *Archives of Microbiology*, 154, 2 : 175-178.
- RAINIERI S. et I.S. PRETORIUS, 2000 « Selection and improvement of wine yeasts », 50 : 15-31.
- RAJA H.A., A.N. MILLER, C.J. PEARCE et N.H. OBERLIES, 2017 « Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community », *Journal of Natural Products*, 80, 3 : 756-770.
- RAMÍREZ M. et R. VELÁZQUEZ, 2018 « The Yeast *Torulasporea delbrueckii*: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking », *Fermentation*, 4, 4 : 94.
- RANTSIU K., P. DOLCI, S. GIACOSA, F. TORCHIO, R. TOFALO, S. TORRIANI, G. SUZZI, L. ROLLE et L. COCOLIN, 2012 « *Candida zemplinina* Can Reduce Acetic Acid Produced by *Saccharomyces cerevisiae* in Sweet Wine Fermentations », *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 6 : 1987-1994.
- RAYMOND EDER M.L., F. CONTI et A.L. ROSA, 2018 « Differences Between Indigenous Yeast Populations in Spontaneously Fermenting Musts From *V. vinifera* L. and *V. labrusca* L. Grapes Harvested in the Same Geographic Location », *Frontiers in Microbiology*, 9 : 1320.
- RAYMOND EDER M.L., C. REYNOSO, S.C. LAURET et A.L. ROSA, 2017 « Isolation and Identification of the Indigenous Yeast Population during Spontaneous Fermentation of Isabella (*Vitis labrusca* L.) Grape Must », *Frontiers in microbiology*, 8 : 532.
- RAYMOND EDER M.L. et A.L. ROSA, 2020 « Non-tandem repeat polymorphisms at microsatellite loci in wine yeast species », *Molecular Genetics and Genomics*, 295, 3 : 685-693.
- RAYMOND EDER M.L. et A.L. ROSA, 2021 « Genetic, Physiological, and Industrial Aspects of the Fructophilic Non-*Saccharomyces* Yeast Species, *Starmerella bacillaris* », *Fermentation*, 7, 2 : 87.
- REMIZE F., J.L. ROUSTAN, J.M. SABLAYROLLES, P. BARRE et S. DEQUIN, 1999 « Glycerol Overproduction by Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains Leads to Substantial Changes in By-Product Formation and to a Stimulation of Fermentation Rate in Stationary Phase », *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, 65.
- RENAULT P., J. COULON, G. REVEL, J.-C. BARBE et M. BELY, 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 : 40-8.
- RENAULT P., C. MIOT-SERTIER, P. MARULLO, P. HERNÁNDEZ-ORTE, L. LAGARRIGUE, A. LONVAUD-FUNEL et M. BELY, 2009 « Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulasporea delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry », *International Journal of Food Microbiology*, 134, 3 : 201-10.
- RENAULT P.E., W. ALBERTIN et M. BELY, 2013 « An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 9 : 4105-4119.
- RENOUF V., P. STREHAIANO et A. LONVAUD-FUNEL, 2007 « Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE », *OENO One*, 41, 1 : 51.
- RIBEREAU-GAYON P., D. DUBOURDIEU, B. DONECHE et A. LONVAUD-FUNEL, 2020 *1 Traité d'oenologie - Tome 1 : Microbiologie du Vin - Vinifications*, 7^e éd.
- RICHARD G.-F., A. KERREST, I. LAFONTAINE et B. DUJON, 2005 « Comparative Genomics of Hemiascomycete Yeasts: Genes Involved in DNA Replication, Repair, and Recombination », *Molecular Biology and Evolution*, 22, 4 : 1011-1023.
- RIGOTTIER-GOIS L., A.-G. LE BOURHIS, G. GENEVIÈVE, V. ROCHET et J. DORÉ, 2003 « Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of

- microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes », *FEMS Microbiology Ecology*, 43, 2 : 237-245.
- ROCA-MESA H., S. SENDRA, A. MAS, G. BELTRAN et M.-J. TORIJA, 2020 « Nitrogen Preferences during Alcoholic Fermentation of Different Non-*Saccharomyces* Yeasts of Oenological Interest », *Microorganisms*, 8, 2 : 157.
- ROLLERO S., A. BLOEM, A. ORTIZ-JULIEN, C. CAMARASA et B. DIVOL, 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.
- ROMANO P., G. SUZZI, G. COMI, R. ZIRONI et M. MAIFRENI, 1997 « Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts », *Journal of Applied Microbiology*, 82, 5 : 615-618.
- ROSSIGNOL T., L. DULAU, A. JULIEN et B. BLONDIN, 2003 « Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation », *Yeast*, 20, 16 : 1369-1385.
- ROSSO A.M., 2012 « Beer and wine in antiquity: beneficial remedy or punishment imposed by the Gods? », *Acta medico-historica adriatica : AMHA*, 10, 2 : 237-262.
- ROSSOUW D., B. BAGHERI, M.E. SETATI et F.F. BAUER, 2015 « Co-Flocculation of Yeast Species, a New Mechanism to Govern Population Dynamics in Microbial Ecosystems », *PLoS one*, 10, 8 : 0136249.
- ROSSOUW D. et F.F. BAUER, 2016 « Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity », *Food Microbiology*, 55 : 32-46.
- ROSSOUW D., S.P. MEIRING et F.F. BAUER, 2018 « Modifying *Saccharomyces cerevisiae* Adhesion Properties Regulates Yeast Ecosystem Dynamics » A. P. Mitchell (dir.), *mSphere*, 3, 5 : e00383-18.
- ROUDIL L., P. RUSSO, C. BERBEGAL, W. ALBERTIN, G. SPANO et V. CAPOZZI, 2020 « Non-*Saccharomyces* Commercial Starter Cultures: Scientific Trends, Recent Patents and Innovation in the Wine Sector », *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 11, 1 : 27-39.
- RUIZ J., M. DE CELIS, J. DIAZ-COLUNGA, J.C. VILA, B. BENITEZ-DOMINGUEZ, J. VICENTE, A. SANTOS, A. SANCHEZ et I. BELDA, 2023 « Predictability of the community-function landscape in wine yeast ecosystems », *Molecular Systems Biology*, n/a, n/a : e11613.
- SABLAYROLLES J.M., 2009 « Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect », *Food Research International*, 42, 4 : 418-424.
- SANTILLÁN D., A. IGLESIAS, I. LA JEUNESSE, L. GARROTE et V. SOTES, 2019 « Vineyards in transition: A global assessment of the adaptation needs of grape producing regions under climate change », *Science of The Total Environment*, 657 : 839-852.
- SANTOS M.A., G. KEITH et M.F. TUIITE, 1993 « Non-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3' (leucine) anticodon. », *The EMBO Journal*, 12, 2 : 607-616.
- SAUBIN M., H. DEVILLERS, L. PROUST, C. BRIER, C. GRONDIN, M. PRADAL, J.-L. LEGRAS et C. NEUVÉGLISE, 2019 « Investigation of Genetic Relationships Between *Hanseniaspora* Species Found in Grape Musts Revealed Interspecific Hybrids With Dynamic Genome Structures », *Frontiers in microbiology*, 10 : 2960.
- SCANSANI S., N. VAN WYK, K.B. NADER, B. BEISERT, S. BREZINA, S. FRITSCH, H. SEMMLER, L. PASCH, I.S. PRETORIUS, C. VON WALLBRUNN, S. SCHNELL et D. RAUHUT, 2022 « The film-forming *Pichia* spp. in a winemaker's toolbox: A simple isolation procedure and their performance in a mixed-culture fermentation of *Vitis vinifera* L. cv. Gewürztraminer must », *International Journal of Food Microbiology*, 365 : 109549.
- SCHACHERER J., J.A. SHAPIRO, D.M. RUDERFER et L. KRUGLYAK, 2009 « Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae* », *Nature*, 458, 7236 : 342-5.
- SCHMIDT S.A., R. KOLOUCHOVA, A.H. FORGAN et A.R. BORNEMAN, 2020 « Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Competitive Fitness in Enologically Relevant Environments by Barcode Sequencing », *G3 (Bethesda, Md.)*, 10, 2 : 591-603.

- SCHMITT M.J. et F. BREINIG, 2006 « Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection », *Nature Reviews Microbiology*, 4, 3 : 212-221.
- SEGUINOT P., 2019 « Vers une meilleure exploitation du potentiel enzymatique et métabolique de *Metschnikowia pulcherrima* et *Torulaspora delbrueckii* pour la production d'arômes en fermentation oenologique ».
- SEGUINOT P., A. ORTIZ-JULIEN et C. CAMARASA, 2020 « Impact of Nutrient Availability on the Fermentation and Production of Aroma Compounds Under Sequential Inoculation With *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* », *Frontiers in microbiology*, 11 : 305.
- SEKI A. et S. RUTZ, 2018 « Optimized RNP transfection for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in primary T cells », *The Journal of Experimental Medicine*, 215, 3 : 985-97.
- SERPAGGI V., F. REMIZE, A.S.-L. GRAND et H. ALEXANDRE, 2010 « Specific identification and quantification of the spoilage microorganism *Brettanomyces* in wine by flow cytometry: A useful tool for winemakers », *Cytometry Part A*, 77A, 6 : 497-499.
- SETATI M.E., D. JACOBSON, U.-C. ANDONG, F.F. BAUER et F.F. BAUER, 2012 « The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map », *PLoS one*, 7, 12 : 52609.
- SHADE A., H. PETER, S.D. ALLISON, D.L. BAHO, M. BERGA, H. BÜRGMANN, D.H. HUBER, S. LANGENHEDER, J.T. LENNON, J.B.H. MARTINY, K.L. MATULICH, T.M. SCHMIDT et J. HANDELSMAN, 2012 « Fundamentals of microbial community resistance and resilience », *Frontiers in microbiology*, 3 : 417.
- SHEFF M.A. et K.S. THORN, 2004 « Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae* », *Yeast*, 21, 8 : 661-670.
- SHEKHAWAT K., F.F. BAUER et M.E. SETATI, 2017 « Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 6 : 2479-2491.
- SHI W.-K., J. WANG, F.-S. CHEN et X.-Y. ZHANG, 2019 « Effect of *Issatchenkia terricola* and *Pichia kudriavzevii* on wine flavor and quality through simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* », *LWT*, 116 : 108477.
- SHONG J., M.R. JIMENEZ DIAZ et C.H. COLLINS, 2012 « Towards synthetic microbial consortia for bioprocessing », *Current opinion in biotechnology*, 23, 5 : 798-802.
- SILVA M., A. PONTES, R. FRANCO-DUARTE, P. SOARES, J.P. SAMPAIO, M.J. SOUSA et P.H. BRITO, 2022 « A glimpse at an early stage of microbe domestication revealed in the variable genome of *Torulaspora delbrueckii*, an emergent industrial yeast », *Molecular Ecology* : mec.16428.
- SILVA-SOUSA F., T. FERNANDES, F. PEREIRA, D. RODRIGUES, T. RITO, C. CAMARASA, R. FRANCO-DUARTE et M.J. SOUSA, 2022 « *Torulaspora delbrueckii* Phenotypic and Metabolic Profiling towards Its Biotechnological Exploitation », *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 8, 6 : 596.
- SIMONIN S., H. ALEXANDRE, M. NIKOLANTONAKI, C. COELHO et R. TOURDOT-MARÉCHAL, 2018 « Inoculation of *Torulaspora delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking », *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 107 : 451-461.
- SIPICZKI M., 2016 « Overwintering of Vineyard Yeasts: Survival of Interacting Yeast Communities in Grapes Mummified on Vines », *Frontiers in microbiology*, 7 : 212.
- SIPICZKI M., 2020 « *Metschnikowia pulcherrima* and Related Pulcherrimin-Producing Yeasts: Fuzzy Species Boundaries and Complex Antimicrobial Antagonism », *Microorganisms*, 8, 7 : 1029.
- SOARES E.V., 2011 « Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review: Yeast flocculation: a review », *Journal of Applied Microbiology*, 110, 1 : 1-18.
- STEENWYK J.L., D.A. OPULENTE, J. KOMINEK, X.-X. SHEN, X. ZHOU, A.L. LABELLA, N.P. BRADLEY, B.F. EICHMAN, N. ČADEŽ, D. LIBKIND, J. DEVIRGILIO, A.B. HULFACHOR, C.P. KURTZMAN, C.T. HITTINGER et A. ROKAS, 2019 « Extensive loss of cell-cycle and DNA repair genes in an ancient lineage of bipolar budding yeasts », *PLOS Biology*, 17, 5 : 3000255.
- STERNES P.R., D. LEE, D.R. KUTYNA et A.R. BORNEMAN, 2017 « A combined meta-barcoding and shotgun metagenomic analysis of spontaneous wine fermentation », *GigaScience*, 6, 7 : 1-10.
- STEWART E.J., 2012 « Growing Unculturable Bacteria », *Journal of Bacteriology*, 194, 16 : 4151-4160.

- STEYN A., M. VILJOEN-BLOOM et W.H. VAN ZYL, 2021 « Valorization of apple and grape wastes with malic acid-degrading yeasts », *Folia microbiologica*, 66, 3 : 341-354.
- STOCKLEY C., A. PASCHKE-KTATZIN, P.-L. TEISSEDE, P. RESTANI, N. GARCIA-TEJEDOR et C. QUINI, 2021 *SO₂ and wine: a review*. OIV - International Organisation of Vine and Wine.
- STUBBENDIECK R.M., C. VARGAS-BAUTISTA et P.D. STRAIGHT, 2016 « Bacterial Communities: Interactions to Scale », *Frontiers in Microbiology*, 7.
- SU Y., P. SEGUINOT, I. SANCHEZ, A. ORTIZ-JULIEN, J.M. HERAS, A. QUEROL, C. CAMARASA et J.M. GUILLAMÓN, 2020 « Nitrogen sources preferences of non-*Saccharomyces* yeasts to sustain growth and fermentation under winemaking conditions », *Food microbiology*, 85 : 103287.
- SUN X. et A. SANCHEZ, 2023 « Synthesizing microbial biodiversity », *Current Opinion in Microbiology*, 75 : 102348.
- SWIEGERS J.H., E.J. BARTOWSKY, P.A. HENSCHKE et I.S. PRETORIUS, 2005 « Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour », *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 2 : 139-173.
- SWIEGERS J.H. et I.S. PRETORIUS, 2005 « Yeast Modulation of Wine Flavor ». in *Advances in Applied Microbiology*. 131-175. Elsevier.
- TAILLANDIER P., Q.P. LAI, A. JULIEN-ORTIZ et C. BRANDAM, 2014 « Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content », *World journal of microbiology & biotechnology*, 30, 7 : 1959-67.
- TAMANG J.P., K. WATANABE et W.H. HOLZAPFEL, 2016 « Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages », *Frontiers in Microbiology*, 7.
- TESNIÈRE C., P. DELOBEL, M. PRADAL et B. BLONDIN, 2013 « Impact of Nutrient Imbalance on Wine Alcoholic Fermentations: Nitrogen Excess Enhances Yeast Cell Death in Lipid-Limited Must » C. Menezes (dir.), *PLoS ONE*, 8, 4 : e61645.
- TILLOY V., A. CADIÈRE, M. EHSANI et S. DEQUIN, 2015 « Reducing alcohol levels in wines through rational and evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* », *International Journal of Food Microbiology*, 213 : 49-58.
- TOFALO R., M. SCHIRONE, S. TORRIANI, K. RANTSIOU, L. COCOLIN, G. PERPETUINI et G. SUZZI, 2012 « Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines », *Food microbiology*, 29, 1 : 18-26.
- TOFALO R., G. SUZZI et G. PERPETUINI, 2021 « Discovering the Influence of Microorganisms on Wine Color », *Frontiers in Microbiology*, 12 : 790935.
- TOJU H., M.S. ABE, C. ISHII, Y. HORI, H. FUJITA et S. FUKUDA, 2020 « Scoring Species for Synthetic Community Design: Network Analyses of Functional Core Microbiomes », *Frontiers in microbiology*, 11 : 1361.
- TONDINI F., C.A. ONETTO et V. JIRANEK, 2020 « Early adaptation strategies of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* to co-inoculation in high sugar grape must-like media », *Food microbiology*, 90 : 103463.
- TÖPFER R. et O. TRAPP, 2022 « A cool climate perspective on grapevine breeding: climate change and sustainability are driving forces for changing varieties in a traditional market », *Theoretical and Applied Genetics*, 135, 11 : 3947-3960.
- TOURLOUSSE D.M., K. NARITA, T. MIURA, M. SAKAMOTO, A. OHASHI, K. SHIINA, M. MATSUDA, D. MIURA, M. SHIMAMURA, Y. OHYAMA, A. YAMAZOE, Y. UCHINO, K. KAMEYAMA, S. ARIOKA, J. KATAOKA, T. HISADA, K. FUJII, S. TAKAHASHI, M. KUROIWA, M. ROKUSHIMA, M. NISHIYAMA, Y. TANAKA, T. FUCHIKAMI, H. AOKI, S. KIRA, R. KOYANAGI, T. NAITO, M. NISHIWAKI, H. KUMAGAI, M. KONDA, K. KASAHARA, M. OHKUMA, H. KAWASAKI, Y. SEKIGUCHI et J. TERAUCHI, 2021 « Validation and standardization of DNA extraction and library construction methods for metagenomics-based human fecal microbiome measurements », *Microbiome*, 9, 1 : 95.
- TRISTEZZA M., M. TUFARIELLO, V. CAPOZZI, G. SPANO, G. MITA et F. GRIECO, 2016 « The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production », *Frontiers in microbiology*, 7 : 670.

- TRONCHONI J., J.A. CUIEL, M.P. SÁENZ-NAVAJAS, P. MORALES, A. DE-LA-FUENTE-BLANCO, P. FERNÁNDEZ-ZURBANO, V. FERREIRA et R. GONZALEZ, 2018 « Aroma profiling of an aerated fermentation of natural grape must with selected yeast strains at pilot scale », *Food Microbiology*, 70 : 214-223.
- TUINGA A.R., 2005 « Interspecific interaction terminology: from mycology to general ecology ».
- UBEDA C., R. HORNEDO-ORTEGA, A.B. CEREZO, M.C. GARCIA-PARRILLA et A.M. TRONCOSO, 2020 « Chemical hazards in grapes and wine, climate change and challenges to face », *Food Chemistry*, 314 : 126222.
- VALERA M.J., E. BOIDO, E. DELLACASSA et F. CARRAU, 2020 « Comparison of the Glycolytic and Alcoholic Fermentation Pathways of *Hanseniaspora vineae* with *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts », *Fermentation*, 6, 3 : 78.
- VAN LEEUWEN C. et P. DARRIET, 2016 « The Impact of Climate Change on Viticulture and Wine Quality », *Journal of Wine Economics*, 11, 1 : 150-167.
- VAN WYK N., J. BADURA, C. VON WALLBRUNN et I.S. PRETORIUS, 2023 « Exploring future applications of the apiculate yeast *Hanseniaspora* », *Critical Reviews in Biotechnology* : 1-20.
- VAQUERO C., I. LOIRA, M.A. BAÑUELOS, J.M. HERAS, R. CUERDA et A. MORATA, 2020 « Industrial Performance of Several *Lachancea thermotolerans* Strains for pH Control in White Wines from Warm Areas », *Microorganisms*, 8, 6.
- VARELA C., C. BARTEL, C. ONETTO et A. BORNEMAN, 2020 « Targeted gene deletion in *Brettanomyces bruxellensis* with an expression-free CRISPR-Cas9 system », *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 16 : 7105-7115.
- VARELA C. et A.R. BORNEMAN, 2017 « Yeasts found in vineyards and wineries », *Yeast (Chichester, England)*, 34, 3 : 111-128.
- VARELA C., K. CUIJVERS, S. VAN DEN HEUVEL, M. RULLO, M. SOLOMON, A. BORNEMAN et S. SCHMIDT, 2021 « Effect of Aeration on Yeast Community Structure and Volatile Composition in Uninoculated Chardonnay Wines », *Fermentation*, 7, 2 : 97.
- VAN DE VELDE C.C., C. JOSEPH, A. BICLOT, G.R.B. HUYS, V.B. PINHEIRO, K. BERNAERTS, J. RAES et K. FAUST, 2022 « Fast quantification of gut bacterial species in cocultures using flow cytometry and supervised classification », *ISME Communications*, 2, 1.
- VENEMA K. et P. VAN DEN ABBEELE, 2013 « Experimental models of the gut microbiome », *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 27, 1 : 115-26.
- VENKATESH A., A.L. MURRAY, A.B. BOYLE, L. QUINN FARRINGTON, T.J. MAHER, P. Ó'GAORA, K.H. WOLFE, C.E. O'BRIEN et G. BUTLER, 2018 « Draft Genome Sequence of a Highly Heterozygous Yeast Strain from the *Metschnikowia pulcherrima* Subclade, UCD127 », *Genome Announcements*, 6, 25 : e00550-18.
- VENTURELLI O.S., A.C. CARR, G. FISHER, R.H. HSU, R. LAU, B.P. BOWEN, S. HROMADA, T. NORTHEN et A.P. ARKIN, 2018 « Deciphering microbial interactions in synthetic human gut microbiome communities », *Molecular Systems Biology*, 14, 6 : 8157.
- VICENTE J., F. CALDERÓN, A. SANTOS, D. MARQUINA et S. BENITO, 2021 « High Potential of *Pichia kluyveri* and Other *Pichia* Species in Wine Technology », *International journal of molecular sciences*, 22, 3 : 1196.
- VICENTE J., J. RUIZ, I. BELDA, I. BENITO-VÁZQUEZ, D. MARQUINA, F. CALDERÓN, A. SANTOS et S. BENITO, 2020 « The Genus *Metschnikowia* in Enology », *Microorganisms*, 8, 7.
- VIEGAS C.A., M.F. ROSA, I. SÁ-CORREIA et J.M. NOVAIS, 1989 « Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic Acids Produced during Ethanol Fermentation », *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1 : 21-28.
- VILLALBA M.L., J. SUSANA SÁEZ, S. DEL MONACO, C.A. LOPES et M.P. SANGORRÍN, 2016 « TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspota delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts », *International Journal of Food Microbiology*, 217 : 94-100.
- VRANCKEN G., A.C. GREGORY, G.R.B. HUYS, K. FAUST et J. RAES, 2019 « Synthetic ecology of the human gut microbiota », *Nature reviews. Microbiology*, 17, 12 : 754-763.

- WANG C., A. MAS et B. ESTEVE-ZARZOSO, 2016 « The Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and Non-*Saccharomyces* Yeast during Alcoholic Fermentation Is Species and Strain Specific », *Frontiers in microbiology*, 7 : 502.
- WANG M., Z.A. GLASS et Q. XU, 2017 « Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy », *Gene therapy*, 24, 3 : 144-150.
- WANG Q. et J.J. COLEMAN, 2019 « Progress and Challenges: Development and Implementation of CRISPR/Cas9 Technology in Filamentous Fungi », *Computational and structural biotechnology journal*, 17 : 761-769.
- WHITING G.C., 1976 « Organic Acid Metabolism of Yeasts During Fermentation of Alcoholic Beverages—a Review », *Journal of the Institute of Brewing*, 82, 2 : 84-92.
- WICKHAM H., D. VAUGHAN et M. GIRLICH, 2023 *tidyr: Tidy Messy Data*.
- WINDHOLTZ S., L. DUTILH, M. LUCAS, J. MAUPEU, A. VALLET-COURBIN, L. FARRIS, J. COULON et I. MASNEUF-POMARÈDE, 2021a « Population Dynamics and Yeast Diversity in Early Winemaking Stages without Sulfites Revealed by Three Complementary Approaches », *Applied Sciences*, 11, 6 : 2494.
- WINDHOLTZ S., C. NIOI, J. COULON et I. MASNEUF-POMAREDE, 2023 « Bioprotection by non-*Saccharomyces* yeasts in oenology: Evaluation of O₂ consumption and impact on acetic acid bacteria », *International Journal of Food Microbiology*, 405 : 110338.
- WINDHOLTZ S., P. REDON, S. LACAMPAGNE, L. FARRIS, G. LYTRA, M. CAMELEYRE, J.-C. BARBE, J. COULON, C. THIBON et I. MASNEUF-POMARÈDE, 2021b « Non-*Saccharomyces* yeasts as bioprotection in the composition of red wine and in the reduction of sulfur dioxide », *LWT*, 149 : 111781.
- WOLFE B.E., J.E. BUTTON, M. SANTARELLI et R.J. DUTTON, 2014 « Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity », *Cell*, 158, 2 : 422-433.
- WOLFE B.E. et R.J. DUTTON, 2015 « Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems », *Cell*, 161, 1 : 49-55.
- WOLFE K.H. et D.C. SHIELDS, 1997 « Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome », *Nature*, 387, 6634 : 708-713.
- XAVIER J.B., 2011 « Social interaction in synthetic and natural microbial communities », *Molecular Systems Biology*, 7, 1 : 483.
- XENOPHONTOS C., M. TAUBERT, W.S. HARPOLE et K. KÜSEL, 2021 « Phylogenetic and metabolic diversity have contrasting effects on the ecological functioning of bacterial communities », *FEMS microbiology ecology*, 97, 3.
- YAP N.A., M. DE BARROS LOPES, P. LANGRIDGE et P.A. HENSCHKE, 2000 « The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation: killer yeast activity in winemaking », *Journal of Applied Microbiology*, 89, 3 : 381-389.
- ZENGLER K. et L.S. ZARAMELA, 2018 « The social network of microorganisms - how auxotrophies shape complex communities », *Nature reviews. Microbiology*, 16, 6 : 383-390.
- ZHANG H., B. PEREIRA, Z. LI et G. STEPHANOPOULOS, 2015 « Engineering *Escherichia coli* coculture systems for the production of biochemical products », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 27 : 8266-71.
- ZHANG P., R. ZHANG, S. SIRISENA, R. GAN et Z. FANG, 2021 « Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review », *Food Microbiology*, 100 : 103859.
- ZHANG Q. et S. LYU, 2022 « Microbial Interactions in a Vitamin C Industrial Fermentation System: Novel Insights and Perspectives » I. Cann (dir.), *Applied and Environmental Microbiology*, 88, 18 : e01212-22.
- ZIMMER M., 2002 « Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior », *Chemical Reviews*, 102, 3 : 759-782.
- ZOTT K., C. MIOT-SERTIER, O. CLAISSE, A. LONVAUD-FUNEL et I. MASNEUF-POMAREDE, 2008 « Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking », *International Journal of Food Microbiology*, 125, 2 : 197-203.

Résumé

Un intérêt grandissant est porté à la compréhension et la description des communautés microbiennes naturelles impliquées dans la fermentation de produits alimentaires comme le vin qui fait l'objet de nombreuses études analysant la diversité et la dynamique des différentes levures présentes lors de la fermentation alcoolique. Le moût est généralement riche en levures appartenant aux genres *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia* ou *Torulaspora*, appelées non-*Saccharomyces*. Elles sont ensuite progressivement supplantées par *S. cerevisiae* qui domine la phase active de la fermentation. La diversité des levures présentes et les variations environnementales rendent l'étude des mécanismes d'interaction régissant la dynamique microbienne au cours de la fermentation complexe. L'objectif de cette thèse était donc de développer un consortium modèle composé de plusieurs espèces de levures représentatif de la diversité trouvée lors de la vinification. L'utilisation d'une communauté synthétique permet de simplifier l'étude de la dynamique de la communauté microbienne au cours de la fermentation en réduisant le nombre d'espèces et en utilisant des conditions environnementales maîtrisées. Sur la base d'un travail bibliographique, nous avons ainsi construit un consortium modèle composé de six espèces, chacune marquée avec une combinaison unique de fluorochrome permettant de suivre leur proportion en mélange complexe par cytométrie en flux. Ces espèces nous ont ainsi permis l'étude d'interaction par paires ainsi qu'en consortia, notamment pour tester un éventuel lien entre diversité α initiale et performance de fermentation lors d'un stress osmotique. Plus globalement, cet outil microbiologique pourra être utile pour comprendre une vaste gamme de questions d'écologie microbienne en fermentation œnologique.

Summary

There is a growing interest in understanding and describing natural microbial communities involved in the fermentation of food products such as wine. Numerous studies have analyzed the diversity and dynamics of the different yeasts present during wine alcoholic fermentation. Initially, grape must is generally rich in yeasts belonging to the *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia* or *Torulaspora* genera that are referred to as non-*Saccharomyces*. These non-*Saccharomyces* are gradually taken over by *Saccharomyces cerevisiae*, which dominates the active phase of fermentation. The diversity of yeasts present and environmental variations make it complex to study the interaction mechanisms governing microbial dynamics during fermentation. The aim of this work was therefore to develop a model consortium including several yeast species representative of the diversity found during winemaking. The use of a synthetic community simplifies the study of microbial community dynamics during fermentation by reducing the number of species and using controlled environmental conditions. Based on a literature review, we constructed a model consortium consisting of six species, each labelled with a unique combination of fluorochromes. This enabled us to monitor their proportion in a complex mixture using flow cytometry. We studied pairwise interactions in pairs and consortia of these species, in particular to test a possible link between initial α diversity and fermentation performance under osmotic stress. More generally, this microbiological tool could be useful for understanding a wide range of microbial ecology issues in enological fermentation.