



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

Préparée à l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe Vin Aliment Microbiologie et Stress

Ecole doctorale n°554

Ecole doctorale Environnement - Santé

Doctorat en Biologie des organismes

Par

Manon LEBLEUX

Caractérisation du mode de vie biofilm chez la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis*

Thèse présentée et soutenue à DIJON, le 18 mars 2022

Composition du Jury :

Mme REMIZE Fabienne
M. COTON Emmanuel
Mme ALBERTIN Warren
M. BAUER Florian
Mme ROUSSEAU Sandrine
Mme WEIDMANN Stéphanie

Professeur, Université de Montpellier
Professeur, Université de Bretagne Occidentale
Maître de Conférences, ENSCBP Bordeaux
Professeur, Université de Stellenbosch
Maître de Conférences, Université de Bourgogne
Maître de Conférences, Université de Bourgogne

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur/Président du jury
Directrice de thèse
Invitée

A ma famille,

Remerciements

Je remercie l'ensemble de l'équipe Vin Aliment Microbiologie et Stress (VALMiS) de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM) dirigée par le Pr. Laurent Beney et l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (IUVV) pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces travaux de thèse.

Cette thèse n'aurait (assurément) pas été ce qu'elle est sans la Dr. HDR Sandrine Rousseaux, la directrice de ma thèse. J'ai beaucoup appris à ses côtés au cours de ces années de thèse, qui est en fin de compte autant une aventure humaine que scientifique. J'ai compris que le respect, la bienveillance, la remise en question et l'objectivité sont des valeurs qui me sont importantes, avec lesquelles je veux être en accord dans ma carrière de chercheuse.

Je remercie chaleureusement la Pr. Fabienne Remize, le Pr. Emmanuel Coton, la Dr. Warren Albertin et le Pr. Florian Bauer d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je tiens également à remercier la Dr. Monika Coton pour ses conseils lors des comités de suivi de thèse.

Je tiens à remercier la Dr. Stéphanie Weidmann, pour sa gentillesse et sa présence. C'est à travers tes enseignements que j'ai découvert et aimé la microbiologie. Un jour, j'ai eu l'opportunité de participer à un projet sous ta direction, et j'ai foncé. Merci de m'avoir accompagnée tout au long de ce projet.

J'aimerais sincèrement remercier le Pr. Hervé Alexandre. Cela a toujours été un réel plaisir de discuter science avec vous. Votre disponibilité et vos conseils m'ont été précieux au cours de ces trois années.

En écrivant mes remerciements, je pense à celles et ceux qui m'ont donné une chance de voir à quoi ressemblait la vie de chercheur alors que je n'étais qu'une étudiante en licence voulant jeter un coup œil dans un labo, en particulier le Dr. Olivier Lamotte et la Dr. Anne Vejux.

Merci à l'ensemble des personnes de l'UMR PAM et de l'IUVV que j'ai pu côtoyer au cours de ces années et qui rendent la vie au laboratoire la plus agréable et conciliante possible. En particulier, je tiens à remercier Yamina Meslem, Franck Bagala et Vanessa David-Vaizant pour leur aide au quotidien afin de trouver une solution à chaque problème.

Je tiens à remercier les Drs. Raphaëlle Tourdot-Maréchal, Cosette Grandvalet et Chloé Roullier-Gall, dont les portes étaient toujours entrouvertes si j'avais besoin d'une oreille attentive et de conseils.

Merci au Dr. Emmanuel Denimal, arrivé de nulle part mais arrivé au bon moment. Je n'en serais certainement pas là sans toi. Et finalement, cette thèse, elle est pas si pire ...

Je tiens à remercier tous les doctorants et les post-doc pour cette ambiance chaleureuse et pour votre aide au quotidien !

Merci en particulier à Hany Abdo. Nous aurons vécu à peu près la même chose ... Tu m'as montré qu'il y a un après thèse et qu'il faut aller de l'avant. Allez, lève les bras Maurice, c'est plus rigolo quand tu lèves les bras !!

Merci infiniment à Fanny Bordet et Thierry Tran pour votre soutien et votre amitié. Vous êtes sans aucun doute m'a plus belle découverte dans ce projet de thèse. On aura refait le monde ensemble (enfin, on aura déjà commencé par notre labo). Puisse l'aventure continuer encore un peu, ensemble.

Puisque la vie ne se résume pas au labo, je tiens à remercier les copains, les dijonnais, les vieux et très vieux copains, pour ces esquives à mon travail de thèse, certes furtives mais nécessaires ! Merci à Merry1, qui a su me montrer qu'il y avait un monde en dehors de la thèse.

Enfin, je veux remercier ma famille. A mes grands-parents, je vous aime tout simplement, merci d'être là. Merci à ma maman qui a toujours su être à l'écoute avec un soutien sans faille. Tu as toujours cru en moi et tu as toujours LA solution. Merci à mon papa, de m'avoir appris à relativiser et à ne pas donner d'importance à ce qui n'en a pas. Je n'ai peut-être pas volé ma thèse à un clown, mais elle ne sera jamais qu'une des 7 milliards de versions du réel. Il est 22h43, je m'en remets au vent ... Merci à Lise, ma petite sœur dont je suis plus que fier ! On aura toutes les deux trouvé notre voie. Et à toi, mon Timon.

Sommaire

Liste des communications scientifiques	V
Liste des abréviations	VII
Liste des figures	IX
Liste des tableaux	XII
Introduction générale	1
Synthèse bibliographique	5
Partie 1. <i>Brettanomyces bruxellensis</i> , une levure bien adaptée à son environnement	6
1. La levure <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	6
1.1. Origine	6
1.2. Morphologie	7
1.3. Variabilité intraspécifique	8
1.3.1. Méthode non moléculaire	8
1.3.2. Méthodes moléculaires	8
2. Altérations du vin	11
2.1. Micro-organismes d'altération	12
2.2. Le « caractère Brett »	13
2.3. Autres composés produits par <i>B. bruxellensis</i>	15
2.4. Présence et développement de <i>B. bruxellensis</i> lors de la vinification	16
3. Besoins nutritionnels de <i>B. bruxellensis</i>	18
3.1. Sources carbonées	18
3.2. Sources d'azote	20
3.3. Autres éléments	21
4. Métabolisme et croissance de <i>B. bruxellensis</i>	21
4.1. Métabolisme respiratoire et fermentaire	22
4.2. Effet Crabtree	22
4.3. Effet Custer	22
4.4. « Petite » mutation	23
5. Prévenir et éliminer <i>B. bruxellensis</i>	24
5.1. Prévenir la contamination du vin par <i>B. bruxellensis</i>	24
5.2. Éliminer <i>B. bruxellensis</i>	27
6. Capacité d'adaptation et de survie à l'environnement	29
Partie 2. Les biofilms	33
1. Une large définition	33
2. Les étapes de formation d'un biofilm	35
3. Quorum sensing	37
4. Matrice du biofilm	37
5. Biofilms dans le domaine agroalimentaire	41
5.1. Biofilms levuriens : impacts positif et négatif	41
5.2. <i>Brettanomyces bruxellensis</i> et biofilms ?	43
6. Déterminants génétiques et environnementaux de la formation de biofilm	44
6.1. Aspect génétique	44
6.2. La croissance invasive	48
Objectifs de la thèse	53
Matériel biologique et conditions de culture	57
Matériel biologique	58
Conditions de culture	58
Chapitre 1 Etude de la formation de biofilm chez <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	61
Contexte scientifique	62
Partie 1. New advances on the <i>Brettanomyces bruxellensis</i> biofilm mode of life	63

1. Introduction	64
2. Materials and methods	65
2.1. Yeast isolates	65
2.2. Genotyping by microsatellite analysis	65
2.3. Biofilm formation in YPD medium	66
2.3.1. YPD cultures	66
2.3.2. Biofilm formation on polystyrene plates	66
2.4. Biofilm formation in wine	66
2.4.1. Wine used	66
2.4.2. Culture adaptation	66
2.4.3. Biofilm formation on stainless steel chips in wine	67
2.4.4. Wine effect on 7 day-aged biofilms	67
2.5. Cell observations	67
2.5.1. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)	67
2.5.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)	68
2.5.3. Epifluorescence microscopy	68
2.6. Statistical analyses	68
3. Results	69
3.1. Biofilm structures	69
3.2. <i>Brettanomyces</i> biofilm mode of life: what's up in wine?	74
3.3. Chlamydospore-like element, a new piece of <i>B. bruxellensis</i> morphotype	75
4. Discussion	76
5. References	78
Partie 2. Résultats complémentaires	81
1. Contexte scientifique	81
2. Matériel et Méthodes	81
2.1. Souches	81
2.2. Formation de biofilm	81
2.2.1. Formation de biofilm en YPD	82
2.2.2. Formation de biofilm en vin	82
2.3. Observations microscopiques	83
2.3.1. Microscopie électronique à balayage	83
2.3.2. Microscopie optique à transmission	83
2.3.3. Microscopie à épifluorescence	83
2.4. Analyse UHPLC des concentrations d'acide <i>p</i> -coumarique et de 4-éthylphénol	83
3. Evolution du biofilm et structures « biofilm-like »	84
3.1. Biofilm mature	84
3.2. Structures « biofilm-like »	85
4. <i>B. bruxellensis</i> : levure productrice de « chlamydospore-like »	87
5. Capacité à former des biofilms selon le support et le milieu	88
5.1. Formation de biofilm sur différents supports	88
5.1.1. Cinétique de formation de biofilm sur différents supports	88
5.1.2. Influence du support sur la population adhérente	89
5.2. Formation de biofilm dans différents milieux	89
5.3. Production de 4-éthylphénol et biofilm	90
Conclusion du chapitre 1	93
Chapitre 2 Impact des conditions nutritionnelles sur les capacités d'invasion et d'adhésion de <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	95
Contexte scientifique	96
Partie 1. Impact de différentes sources de carbone sur les capacités d'invasion et d'adhésion de <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	97

1. Introduction	98
2. Matériel et Méthodes	99
2.1. Souches	99
2.2. Milieux	100
2.2.1. Composition des milieux	100
2.2.2. Préparation des milieux	101
2.3. Croissance en surface et invasion de la gélose	101
2.3.1. Culture	101
2.3.2. Observations macroscopiques de la croissance en surface et de l'invasion de la gélose	102
2.3.3. Observations microscopiques de l'invasion de la gélose	103
2.3.4. Analyse des images	103
2.3.4.1. Analyse visuelle de la croissance et de l'invasion	103
2.3.4.2. Analyse informatique de l'invasion	105
2.4. Test d'adhésion	106
2.4.1. Cultures	106
2.4.2. Adhésion sur coupon d'acier inoxydable	107
3. Résultats	107
3.1. Etude de la croissance en surface et de l'invasion chez <i>B. bruxellensis</i>	107
3.1.1. Croissance en surface de la gélose	107
3.1.2. Caractérisation de l'invasion de la gélose	108
3.1.3. Traitement informatique de l'invasion	112
3.1.4. Impact des sources de carbone sur l'invasion de <i>B. bruxellensis</i>	113
3.2. Impact des sources de carbone sur la capacité d'adhésion de <i>B. bruxellensis</i>	114
3.3. Lien entre capacités d'invasion de gélose et d'adhésion chez <i>B. bruxellensis</i> ?	115
4. Discussion	116
4.1. La capacité d'invasion chez <i>B. bruxellensis</i> en fonction de différentes sources de carbone	116
4.1.1. Caractérisation de l'invasion chez <i>B. bruxellensis</i>	117
4.1.2. Impact de sources de carbone sur la capacité d'invasion de <i>B. bruxellensis</i>	118
4.1.3. Pipeline d'acquisition et traitement d'images	120
4.2. L'adhésion chez <i>B. bruxellensis</i> en fonction de différences sources de carbone	121
5. Conclusion	122
Partie 2. Résultats complémentaires	123
1. Introduction	123
2. Matériel et Méthodes	123
2.1. Souches	123
2.2. Milieux	123
2.3. Croissance en surface et invasion de la gélose	124
2.4. Adhésion	124
3. Résultats et discussion	124
3.1. Impact de différentes sources d'azote sur la croissance en surface et la capacité d'invasion	124
3.2. Impact de différentes sources d'azote sur la capacité d'adhésion	127
3.3. Lien invasion / adhésion	128
Conclusion du chapitre 2	129
Données complémentaires	130
Chapitre 3 Diversité intraspécifique chez <i>Brettanomyces bruxellensis</i> : morphologie et profil génétique	143
Contexte scientifique	144
Prediction of genetic groups within <i>Brettanomyces bruxellensis</i> through cell morphology using a deep learning tool	145
1. Introduction	146
2. Materials and methods	147
2.1. Yeast isolates and strains	147

2.2. Genetic analysis	148
2.2.1. DNA extraction	148
2.2.2. RAPD-PCR	148
2.3. Cell polymorphism analysis	149
2.3.1. Cultures	149
2.3.2. Microscopic observations	149
2.3.3. Cell shape determination	149
2.3.4. Deep learning	149
3. Results and Discussion	151
3.1. Intraspecific discrimination of the <i>B. bruxellensis</i> isolates into genetic groups	151
3.2. From cell polymorphism to genetic groups	152
3.2.1. Qualitative and quantitative description of cell morphology	152
3.2.2. Use of deep learning to predict the genetic group of <i>B. bruxellensis</i> isolates	154
3.2.3. Does the link between genetic groups and cell morphologies predict any specific functions?	156
4. Conclusions	156
5. References	158
6. Supplementary data	160
Conclusions et perspectives	163
1. Diversité de phénotypes, de la cellule à la population	164
2. Caractérisation de la matrice du biofilm de <i>B. bruxellensis</i>	165
3. Déterminants environnementaux et génétiques de la formation de biofilm	166
4. Prédiction des groupes génétiques	168
Conclusion générale	171
Références bibliographiques	175
Annexes	223

Liste des communications scientifiques

Articles scientifiques

- Lebleux, M.**, Denimal, E., De Oliveira, D., Marin, A., Desroche, N., Alexandre, H., Weidmann, S., Rousseaux, S. (2021). Prediction of Genetic Groups within *Brettanomyces bruxellensis* through Cell Morphology Using a Deep Learning Tool. *J. Fungi* 7, 581. <https://doi.org/10.3390/jof7080581>
- Lebleux, M.**, Abdo, H., Coelho, C., Basmacıyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Weidmann, S., Rousseaux, S. (2020). New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life. *Int. J. Food Microbiol.* 318, 108464. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464>

Articles de vulgarisation scientifique

- Deluchat, M., Lhomme, C., Degueurce, C., Serpaggi, V., Lacroix, R., **Lebleux, M.**, Weidmann, S., Rousseaux, S., (2021). What kind of sanitation should be applied to remove *Brettanomyces bruxellensis* biofilms? *IVES Tech. Rev. vine wine*. <https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2021.4554>
- Weidmann, S., **Lebleux, M.**, Deluchat, M., Basmacıyan, L., Degueurce, C., Serpaggi, V., Rousseaux, S. (2021). *Brettanomyces bruxellensis* : une levure programmée pour persister en milieu hostile. *Rev. des Oenologues* 178, 49–51.
- Rousseaux, S., **Lebleux, M.**, Abdo, H., Basmacıyan, L., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Weidmann, S., (2020). *Brettanomyces bruxellensis* biofilms: a mode of life to withstand environmental stresses? *IVES Tech. Rev. vine wine*. <https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2020.4544>

Communications orales

- Lebleux, M.**, Denimal, E., De Oliveira, D., Marin, A., Desroche, N., Alexandre, H., Weidmann, S., Rousseaux, S. A microscopic glance at the genetic profile of *Brettanomyces bruxellensis*. *Journée Des Doctorants 2021*, UMR PAM, Dijon, France, 25 Octobre 2021
- Rousseaux, S., Lebleux, M.**, Lhomme, C., Abdo, H., Degueurce, C., Serpaggi, S., Albertin, W., Maupeu, J., Alexandre, H., Weidmann, S. Biofilms of *Brettanomyces bruxellensis* and sanitation. *42nd world Congress of Vine and Wine*, Genève, Suisse, 15-19 Juillet 2019
- Lebleux, M.**, Abdo, H., Basmacıyan, L., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Coelho, C., Alexandre, H., Weidmann, S., Rousseaux, S. Advances on *Brettanomyces* biofilms. *Forum des Jeunes Chercheurs*, Dijon, France, 13-14 Juin 2019

Communications affichées

Lebleux, M., Abdo, H., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Guilloux-Bénatier, M., Weidmann, S., Rousseaux, R. Characterization of *Brettanomyces bruxellensis* biofilm, a resistance strategy to persist in wine-related environments. *Macrowine 2021*, Virtuel, 23-30 Juin 2021

Lebleux, M., Abdo, H., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Alexandre, H., Guilloux-Bénatier, M. Weidmann, S., Rousseaux, S. Investigation of the capacity of *Brettanomyces bruxellensis* strains to form biofilms. *Journée Des Doctorants 2019*, UMR PAM, Dijon, France, 2 Octobre 2019

Lebleux, M., Abdo, H., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Alexandre, H., Guilloux-Bénatier, M. Weidmann, S., Rousseaux, S. Investigation of the capacity of *Brettanomyces bruxellensis* strains to form biofilms. *11th International Symposium of Enology of Bordeaux, Oeno 2019*, Bordeaux, France, 25-28 Juin 2019

Liste des abréviations

Français ; *English*

ADN	Acide DéoxyriboNucléique
ADNe	ADN extracellulaire
<i>AFLP</i>	<i>Amplified Fragment-Length Polymorphism</i> Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés
<i>ANOVA</i>	<i>Analysis of variance</i>
ARN	Acide RiboNucléique
ATHP	2-acétyltétrahydropyridine
ATP	Adénosine TriPhosphate
<i>AWRI</i>	<i>Australian Wine Research Institute</i>
<i>BCS</i>	<i>Bovine Calf Serum</i> Sérum de veau bovin
<i>cFDA</i>	<i>5(6)-carboxyFluorescein DiAcetate</i>
<i>CFU</i>	<i>Colony Forming Unit</i>
<i>CLSM</i>	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> Microscopie confocale à balayage laser
<i>CNN</i>	<i>Convolutional Neural Network</i> Réseau neuronal convolutif
CRB	Centre de Ressources Biologiques
<i>DAD</i>	<i>Diode Array Detector</i> Détecteur à barrette de diodes
<i>DMDC</i>	<i>Dimethyl dicarbonate</i> Dicarbonate de diméthyle
<i>DNA</i>	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
DO	Densité Optique
<i>EPS</i>	<i>Extracellular Polymeric Substances</i> Substances extracellulaires polymériques
FA	Fermentation Alcoolique
FEDER	Fonds Européen de Développement Régional
<i>FISH</i>	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i> Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence
<i>FLR</i>	<i>Fluorescence</i>
FML	Fermentation MaloLactique
<i>FTIR-ATR</i>	<i>Fourier Transform InfraRed – Attenuated Total Reflectance</i> Spectroscopie infrarouge de transformée de Fourier – Réflectance totale atténuée
GG	Groupe Génétique
<i>HSD</i>	<i>Honestly Significant Difference</i>
IFV	Institut Français de la Vigne et du vin
<i>ISS-PCR</i>	<i>Intron Splice Site PCR</i>

IUVV	Institut Universitaire de la Vigne et du Vin
m/v	Masse par volume
MDR	<i>Medium-chain Dehydrogenases/Reductases</i> Déshydrogénases/réductases à chaîne moyenne
mtDNA RFLP	<i>Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polymorphisme de longueur des fragments de restriction d'ADN mitochondrial
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCR	<i>Nitrogen Catabolite Repression</i> Répression catabolique azotée
ND	Non disponible
NJ	<i>Neighbour Joining</i>
NQ	Non Quantifié
OD	<i>Optical Density</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Réaction de polymérisation en chaîne
pH	potentiel Hydrogène
QS	<i>Quorum Sensing</i>
QSM	Molécule du Quorum Sensing
RAPD-PCR	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> Amplification aléatoire d'ADN polymorphe
REA-PFGE	<i>Restriction Endonuclease Analysis using Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> Analyse de profils de restriction par endonucléase via électrophorèse en champ pulsé
SCOBY	<i>Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeasts</i> Culture symbiotique de bactéries et de levures
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> Microscopie électronique à balayage
SO ₂	Dioxyde de soufre
UFC	Unité Formant Colonie
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> Chromatographie liquide à ultra haute performance
v/v	Volume par volume
VNBC	<i>Viable But Non Culturable</i>
VNC	Viable mais Non Cultivable
w/v	<i>Weight per volume</i>
YEP-gal	<i>Yeast Extract Peptone Galactose</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose

Liste des figures

Figure 1. Phylogénie des espèces de <i>Brettanomyces</i> . _____	6
Figure 2. Observations microscopiques de cellules de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> . _____	7
Figure 3. Exemples de méthodes moléculaires pour étudier la diversité intraspécifique chez <i>B. bruxellensis</i> . ____	8
Figure 4. Dendrogramme de 1488 isolats de <i>B. bruxellensis</i> répartis dans 6 groupes génétiques représentés par différentes couleurs. _____	11
Figure 5. Exemples d'altérations du vin d'origine microbiologique. _____	12
Figure 6. Micro-organismes impliqués dans la formation des phénols volatils dans le vin. _____	14
Figure 7. Observation au microscope électronique à balayage de fûts infectés par <i>Brettanomyces bruxellensis</i> , (A) illustrant des cellules localisées à plusieurs millimètres de profondeur et (B) la présence de filaments indiqués par des flèches. _____	17
Figure 8. Etapes de la vinification favorables au développement de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> . _____	18
Figure 9. Représentation schématique des voies métaboliques d'utilisation des sources de carbone et d'azote chez <i>B. bruxellensis</i> . _____	23
Figure 10. Apparition de petites colonies lors de la croissance de la souche de <i>S. cerevisiae</i> BY4716 sur gélose. _____	23
Figure 11. Les différentes formes de SO ₂ retrouvées dans le vin. _____	27
Figure 12. Observation microscopique de filaments produits par <i>Brettanomyces bruxellensis</i> . _____	32
Figure 13. Exemples de communautés microbiennes définies comme biofilm dans la littérature, notamment chez les levures. _____	34
Figure 14. Observation au microscope électronique à balayage de biofilm formé par (A) <i>Candida albicans</i> sur un cathéter <i>in vivo</i> ; (B) <i>Candida tropicalis</i> sur polystyrène <i>in vitro</i> . _____	35
Figure 15. Formation de biofilm chez <i>Candida albicans</i> . _____	36
Figure 16. Observation au microscope électronique à balayage d'un biofilm de <i>Candida albicans</i> révélant la matrice. _____	38
Figure 17. (A) Observation au microscope électronique à balayage de micro-organismes englobés dans une matrice formant un biofilm à la surface d'olives en fermentation. (B) Mère de kombucha. (C) Voile à la surface d'un vin de Xérès en vieillissement. _____	42
Figure 18. Observations microscopiques des structures tridimensionnelles formées par trois souches de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> sur microplaque après marquage au Syto9. _____	44
Figure 19. Exemples de gènes impliqués dans la formation de biofilm chez <i>Candida albicans</i> . _____	46
Figure 20. Représentation schématique des multiples réseaux impliqués dans la régulation du gène <i>FLO11</i> . _	47
Figure 21. (A) Liste des phénotypes des mutants de délétion qui ont perdu la capacité à faire des biofilms. (B) Diagramme des mutants de délétion qui ont perdu la capacité à faire des biofilms, des mats et de la croissance invasive. _____	48
Figure 22. Exemples de croissance invasive chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . _____	49
Figure 1.1. CLSM observations of 7 day-aged biofilms formed on polystyrene plates for the 12 selected strains. _____	71
Figure 1.2. Distribution of the 12 strains selected according to length to width (l/w) ratio and cell area measurements (CLSM images). _____	73

Figure 1.3. SEM observations of 7 day-aged microcolonies of strains 11 and 14 developed on stainless steel chips in (A) YPD medium and (B) in wine. _____	73
Figure 1.4. Microcolony growth on stainless steel chips in wine for strains 11 and 14. _____	74
Figure 1.5. Microcolony behavior in wine for (i) cells developed on the chips: (A) strain 11 and (B) strain 14, (ii) cells released from biofilm into the wine: (C) strain 11 and (D) strain 14. _____	75
Figure 1.6. Microscopic observations of “chlamydospore-like” produced by <i>B. bruxellensis</i> in wine. _____	76
Figure 1.7. Stratégie d’étude de différentes conditions lors de la formation de biofilm chez <i>B. bruxellensis</i> . _____	82
Figure 1.8. Photographie d’un biofilm de <i>B. bruxellensis</i> souche 14 développée sur coupon d’acier en YPD après 1 mois d’incubation à 28°C. _____	84
Figure 1.9. Observations au microscope électronique à balayage d’un biofilm de <i>B. bruxellensis</i> âgé de 1 mois en YPD. _____	85
Figure 1.10. (A) Photo et (B) Observation microscopique d’une structure macroscopique développées à l’interface air-liquide. _____	86
Figure 1.11. Photo d’une colonie complexe de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> développée sur gélose. _____	87
Figure 1.12. Présence de chlamydospores-like (A) dans une culture planctonique en milieu YPD, (B) dans une structure macroscopique et (C) dans une colonie développée sur gélose YPD. _____	88
Figure 1.13. Formation de biofilm sur coupons d’acier inoxydable et de bois de chêne en milieu YPD pour les souches 11 et 14 au cours du temps. _____	88
Figure 1.14. Formation de biofilm sur coupon d’acier inoxydable en milieu YPD et vin pour les souches 11 et 14 au cours du temps. _____	90
Figure 1.15. Production de 4-éthylphénol (rouge), consommation d’acide <i>p</i> -coumarique (bleu) et population totale (gris) lors (A) de la formation de biofilm en vin et (B) lors de l’immersion en vin d’un biofilm déjà formé de la souche 11. _____	91
Figure 2.1. Protocole d’évaluation de la croissance en surface de la gélose (avant lavage) et de la capacité d’invasion de la gélose (après lavage). _____	102
Figure 2.2. (A) Système d’acquisition de photos. (B) Exemple de photo d’une plaque de culture contenant des milieux gélosés. _____	103
Figure 2.3. Classification visuelle des cultures (dans les puits) selon l’intensité de croissance en surface. Une photo représentative de chaque classe est présentée. _____	104
Figure 2.4. Classification visuelle des cultures (dans les puits) selon l’intensité d’invasion de la gélose. Une photo représentative de chaque classe est présentée. _____	104
Figure 2.5. Exemple d’une photo d’invasion après traitement par l’algorithme. _____	106
Figure 2.6. Vues latérales de la gélose lors (A) d’une faible invasion et (B) d’une forte invasion par <i>Brettanomyces bruxellensis</i> . (1) Vue macroscopique d’une coupe entre lame et lamelle. (2) Observations microscopiques (×10) des zones envahies (microscope B-383Pli). (3) Observations microscopiques (×40) des cellules dans les zones envahies (Microscope EVOS® FL). _____	109
Figure 2.7. Exemples de différentes structures multicellulaires observées à l’intérieur de la gélose lors de la croissance invasive de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> . _____	110
Figure 2.8. Comparaison des résultats des deux méthodes de classification de l’invasion chez <i>Brettanomyces bruxellensis</i> . _____	113
Figure 2.9. Population de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> adhérente sur coupon d’acier inoxydable après 24h dans différents milieux contenant différentes sources de carbone. _____	115

Figure 2.10. Population de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> adhérente sur coupon d'acier inoxydable après 24h dans différents milieux contenant différentes sources d'azote. _____	127
Figure 2.S1. Photos des cultures de seize souches de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> sur différents milieux gélosés variables en source de carbone avant lavage (Croissance sur la surface de la gélose) après 7 jours d'incubation en aérobiose ou anaérobiose. _____	130
Figure 2.S2. Photos des cultures de seize souches de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> sur différents milieux gélosés variables en source de carbone après lavage (Invasion de la gélose) après 7 jours d'incubation en aérobiose ou anaérobiose. _____	134
Figure 2.S3. Comparaison de la détection de l'invasion par analyse visuelle (à l'œil) et par analyse informatique (détection par l'algorithme de traitement d'images). _____	138
Figure 2.S4. Photos des cultures de 4 souches de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> sur différents milieux gélosés variables en source d'azote (A) avant lavage (Croissance sur la surface de la gélose) et (B) après lavage (Invasion de la gélose) après 7 jours d'incubation en aérobiose. _____	139
Figure 3.1. Typical microscopic image divided into thumbnails. _____	150
Figure 3.2. Random Amplified Polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR) profiles obtained with each primer, OPA-02, OPA-03 and OPA-09, for 74 isolates of <i>Brettanomyces bruxellensis</i> . _____	151
Figure 3.3. Polymorphism of yeast cells among 74 <i>Brettanomyces bruxellensis</i> isolates: (A) elongated cells, (B) small cells, (C) round cells and (D) presence of multicellular structure. (E) Distribution of 7400 cells of <i>B. bruxellensis</i> (100 cells per strain) according to length to width (l/w) ratio and area measurements. _____	153
Figure 3.4. Distribution of 74 isolates of <i>Brettanomyces bruxellensis</i> according to average length to width (l/w) ratio and average area measurements. _____	154
Figure 3.5. Confusion matrix for the classification of 4 genetic groups from dataset1. _____	155
Figure 3.S1. Verification of the reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR) adapted method _____	160

Liste des tableaux*

Tableau 1. Exemples de sources de carbone utilisées par <i>Brettanomyces bruxellensis</i> pour sa croissance. ____	19
Tableau 2. Classification des acides aminés selon leur potentiel pour stimuler la croissance de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> en aérobiose ou en anaérobiose. _____	21
Tableau 3. Exemples de toxines « killer » produites par des levures non- <i>Saccharomyces</i> contre <i>Brettanomyces bruxellensis</i> ayant une application potentielle dans l'industrie vinicole. _____	25
Tableau 4. Principales méthodes utilisées pour la détection de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> . _____	26
Tableau 5. Fonctions des substances extracellulaires polymériques (EPS) dans les biofilms bactériens. ____	38
Tableau 6. Exemples de composition en EPS de la matrice de biofilms de levures. _____	39
Tableau 7. Liste des isolats (numérotés de 1 à 65) et des souches (AWRI1499, CDR3, CDR9, CDR11, CDR12, CDR217, CDR219, LO2E2, LO417, LO6/036) de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> utilisés dans ce projet de thèse. _____	58
Tableau 1.1. Distribution of the 65 isolates among 34 clonal groups in the 6 genetic groups (GG) described by Avramova <i>et al.</i> , 2018a. _____	69
Tableau 1.2. Biofilm growth of the 12 selected strains in YPD medium on polystyrene plates. _____	70
Tableau 1.3. Average values of cell area and of length to width (l/w) ratio and shape of the cells for the 12 selected strains obtained from CLSM images. _____	72
Tableau 1.4. Croissance en biofilm de la souche 14 sur acier inoxydable en YPD. _____	85
Tableau 2.1. Composition des milieux gélosés utilisés pour évaluer la capacité de croissance en surface et la capacité d'invasion de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> . _____	100
Tableau 2.2. Composition du mix d'acides aminés et concentration finale dans les milieux testés. _____	101
Tableau 2.3. Classification informatique de l'invasion selon le niveau de gris obtenu après application de la méthode de partitionnement k-means. _____	106
Tableau 2.4. Evaluation de la croissance de seize souches de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> sur des milieux gélosés contenant différentes sources de carbone en aérobiose. _____	108
Tableau 2.5. Attribution des classes informatiques pour l'ensemble des conditions testées en aérobiose selon différentes sources de carbone. _____	113
Tableau 2.6. Comparaison des capacités de croissance en surface de gélose, d'invasion de gélose et d'adhésion de quatre souches de <i>B. bruxellensis</i> en présence de différentes concentrations en glucose. _____	116
Tableau 2.7. Composition des milieux gélosés utilisés pour évaluer la capacité de croissance en surface et la capacité d'invasion de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> . _____	124
Tableau 2.8. Evaluation de (A) la croissance en surface de gélose et (B) de l'invasion de gélose de seize souches de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> sur des milieux gélosés contenant différentes sources d'azote en aérobiose. _____	125
Tableau 2.9. Comparaison des capacités de croissance en surface de gélose, d'invasion de gélose et d'adhésion de quatre souches de <i>B. bruxellensis</i> en présence de différentes sources d'azote. _____	128
Tableau 2.S1. Evaluation de la croissance de seize souches de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> sur des milieux gélosés contenant différentes sources de carbone en anaérobiose. _____	140
Tableau 2.S2. Evaluation de la capacité d'invasion de seize souches de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> à l'intérieur des milieux gélosés contenant différentes sources de carbone en aérobiose. _____	141
Tableau 3.1. List of isolates and strains used in this study. _____	148

Tableau 3.2. Performance of the Convolutional Neural Network (CNN) GoogleNet trained and validated with dataset1 to classify genetic groups from microscopic images. _____ 155

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

Introduction générale

La consommation mondiale de vin a été estimée à 244 millions d'hectolitres en 2018, dont 26 millions d'hectolitres en France, en faisant le 2^{ème} pays consommateur de vin (OIV, 2021). Cependant, les vins peuvent être sujets à plusieurs défauts. Parmi les processus qui altèrent la qualité du vin, la production de phénols volatils est largement répandue et concerne plus d'un quart des vins rouges de Bourgogne non conformes (BIVB, 2017). La production de phénols volatils est liée au développement de la levure *Brettanomyces bruxellensis*, très redoutée par les vignerons. Un récent sondage (réalisé en Californie) révèle que la majorité des acteurs du secteur interrogés considèrent *B. bruxellensis* comme une menace qu'ils s'efforcent de maîtriser. La perte économique liée au déclassement de vins contaminés par *B. bruxellensis* est conséquente et peut atteindre 1 million de dollars pour une cave adoptant des approches modérées pour lutter contre *B. bruxellensis* (Alston *et al.*, 2021). En France, il est estimé que cette levure est présente dans 50% des cuvées en cours d'élevage (ITV-France, 2006).

Ainsi, la recherche en œnologie s'efforce d'accroître les connaissances au sujet de *B. bruxellensis* et des conditions de production des phénols volatils pour améliorer la gestion des contaminations et de l'altération du vin. Grâce aux découvertes faites sur l'origine des contaminations, et sur le comportement de *B. bruxellensis* dans le vin et l'environnement lié au produit, les pratiques ont évolué et des moyens de contrôle ont été mis en place pour limiter les contaminations tout au long du processus de vinification. Malgré tout, le contrôle de l'altération du vin par *B. bruxellensis* reste actuellement le problème microbien le plus préoccupant pour la qualité du vin rouge principalement et pose de sérieuses contraintes dans le contexte actuel de réduction des intrants en œnologie et de changement climatique (Escudier *et al.*, 2014; Malfeito-Ferreira, 2018; Van Leeuwen, 2015). Ainsi, il est nécessaire d'élargir le champ d'investigations et d'envisager de nouvelles pistes pour expliquer la persistance de cette levure dans l'environnement viti-vinicole.

Dans l'industrie agro-alimentaire, le mode de vie biofilm est connu pour conférer une meilleure résistance aux stress. Son contrôle représente un véritable défi pour éviter l'implantation et la persistance de micro-organismes dans l'environnement. Ainsi, au regard des problématiques de contaminations récurrentes d'aliments qu'engendrent les biofilms, il serait pertinent de s'interroger sur la possibilité de formation de biofilm chez la levure *B. bruxellensis*.

Plusieurs indices en faveur de cette capacité potentiellement développée par *B. bruxellensis* existent dans la littérature (adhésion à des surfaces, implication dans des biofilms). Cependant, peu de données sont disponibles à propos de la formation de biofilm chez *B. bruxellensis*. Ainsi,

l'objectif de ce travail de thèse est de caractériser le mode de vie biofilm chez la levure d'altération *B. bruxellensis*. L'apport de nouvelles connaissances participeront au développement de moyens de lutte adaptés contre le développement de *B. bruxellensis*, la contamination du vin et son altération.

Synthèse bibliographique

Partie 1. *Brettanomyces bruxellensis*, une levure bien adaptée à son environnement

1. La levure *Brettanomyces bruxellensis*

1.1. Origine

« I have called it *Brettanomyces* ». C'est ainsi que parut pour la première fois le nom *Brettanomyces* en 1904, lorsque Niels Hjelte Claussen identifia la levure impliquée dans la fermentation des bières anglaises (Claussen, 1904). Aujourd'hui, il y a 5 espèces admises dans le genre *Brettanomyces* : *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. custersianus*, *B. naardenensis* et *B. nanus* (**Figure 1**). Récemment, une nouvelle espèce, *B. acidodurans*, a été proposée, bien qu'elle n'est pas été complètement acceptée en raison d'une divergence génétique élevée par rapport aux 5 autres espèces (Péter *et al.*, 2017). L'espèce *B. bruxellensis*, parfois appelée « Brett », est la plus décrite notamment pour son implication dans une large gamme de produits fermentés, tels que le vin, la bière, le kombucha, le kéfir, le cidre, la tequila, les produits laitiers, les olives noires ou le bioéthanol (Smith and Divol, 2016; Steensels *et al.*, 2015). Récemment, cette levure a été retrouvée dans une niche écologique totalement différente. En effet, *B. bruxellensis* a été identifiée parmi les espèces dominantes du mycobiote intestinal des individus d'une population d'Afrique du Sud avec un régime dit « urbain » (consommation accrue d'aliments transformés dont des produits fermentés) (Kabwe *et al.*, 2020).

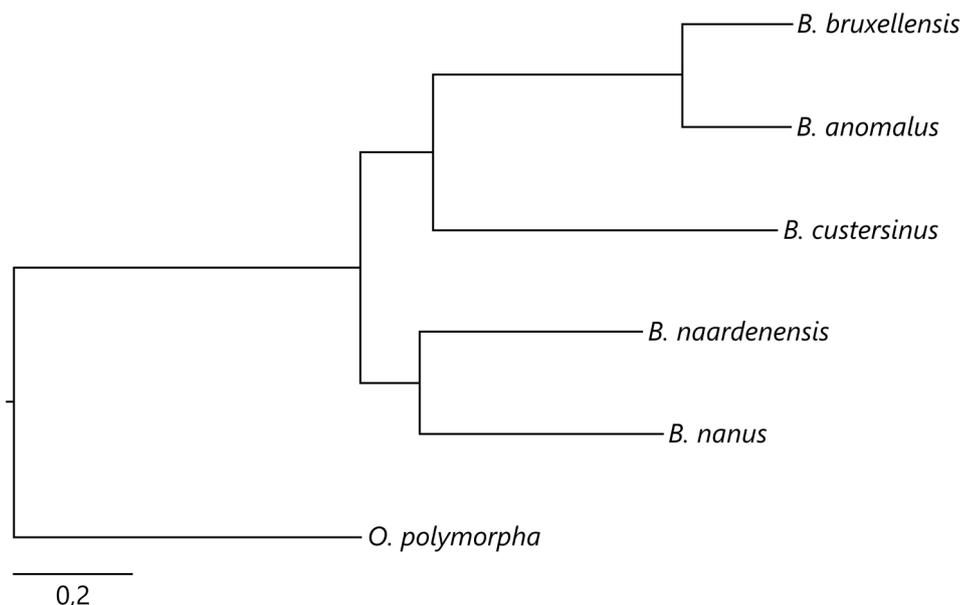


Figure 1. Phylogénie des espèces de *Brettanomyces*. L'espèce *B. acidodurans* est exclue de cette représentation. *Ogataea polymorpha* est utilisée comme souche de référence hors groupe. Adapté de Roach and Borneman (2020).

1.2. Morphologie

Les cellules de *B. bruxellensis* se multiplient par bourgeonnement multipolaire, ce qui conduit à l'apparition de cicatrices (Smith, 2011). Une forte hétérogénéité de formes des cellules a été décrite dans la littérature, amenant à l'utilisation d'un large éventail de descripteurs : circulaire, ovale, elliptique, ogivale, ellipsoïdale, allongée, en forme de carotte, de grain de riz, de bateau (Agnolucci *et al.*, 2009; Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000; Echeverrigaray *et al.*, 2013; Lentz *et al.*, 2014; Louw *et al.*, 2016; Martyniak *et al.*, 2017; Oelofse, 2008; Smith, 2011; Tran *et al.*, 2021; Vigentini *et al.*, 2013). Par ailleurs, des phénomènes de regroupement de cellules ont été observés, aboutissant à des cultures contenant des cellules seules ou groupées en paquet plus ou moins denses (Lentz *et al.*, 2014; Louw *et al.*, 2016). Cette diversité de morphologie chez *B. bruxellensis* rend l'identification de cette espèce difficile par observation microscopique (**Figure 2**).

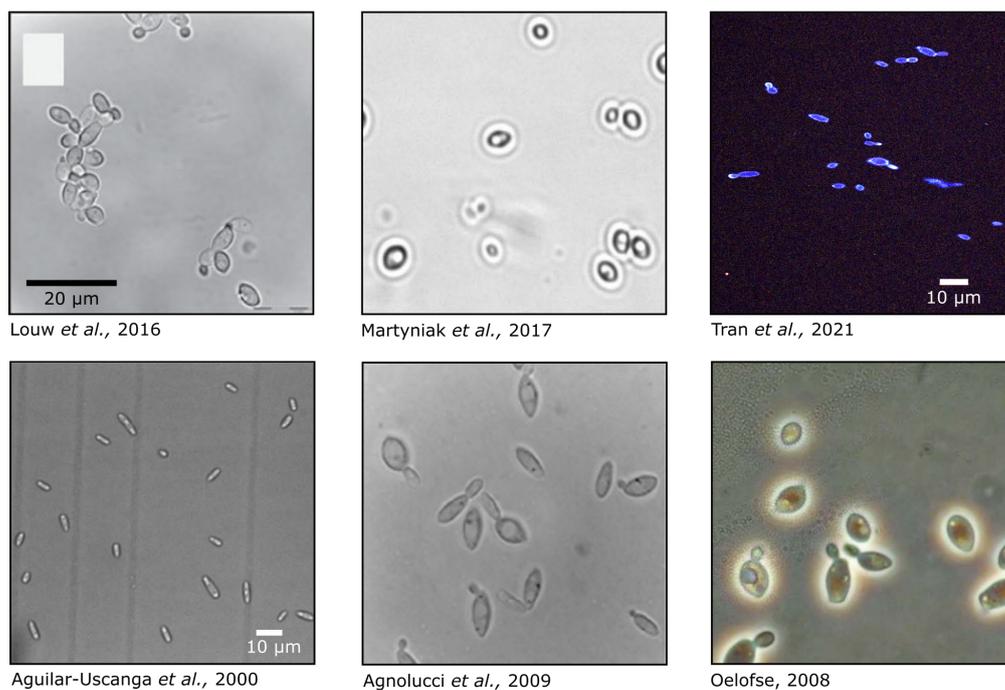


Figure 2. Observations microscopiques de cellules de *Brettanomyces bruxellensis*. Les échelles ont été précisées lorsqu'elles étaient disponibles.

Par ailleurs, les individus du genre *Brettanomyces* sont anamorphes. La forme téléomorphe a été introduite sous le nom *Dekkera* après observation de spores en 1960 (Van der Walt and Van Kerken, 1960). Cependant, cette étude constitue la seule donnée sur la formation de spores chez *B. bruxellensis*. De plus, de manière concordante avec l'approche « one fungus, one name » (Taylor, 2011), le nom *Brettanomyces* est conservé pour la suite de ce manuscrit.

1.3. Variabilité intraspécifique

Chez l'espèce *B. bruxellensis*, une importante diversité existe entre les souches, à l'échelle phénotypique et génétique (Avramova *et al.*, 2018b; Conterno *et al.*, 2006; Curtin *et al.*, 2012; Vigentini *et al.*, 2008). Plusieurs études ont exploré la diversité génétique conduisant à la discrimination intraspécifique au sein de l'espèce *B. bruxellensis*.

1.3.1. Méthode non moléculaire

L'utilisation de la spectroscopie FTIR-ATR (Fourier Transform InfraRed – Attenuated Total Reflectance) permet d'obtenir des informations sur la composition moléculaire des cellules exposées à un rayonnement infrarouge (Wenning and Scherer, 2013). Cet outil permet une discrimination de différentes souches d'une espèce, de manière rapide et non invasive (Adt *et al.*, 2010; Grangeteau *et al.*, 2015). Cependant, cette méthode est peu utilisée chez *B. bruxellensis* puisque peu de bases de données sont disponibles pour ce micro-organisme et qu'une standardisation du protocole est nécessaire (Oelofse *et al.*, 2010).

1.3.2. Méthodes moléculaires

L'ensemble des autres méthodes utilisées pour la discrimination intraspécifique chez *B. bruxellensis* nécessite une étape d'extraction d'ADN (**Figure 3**).

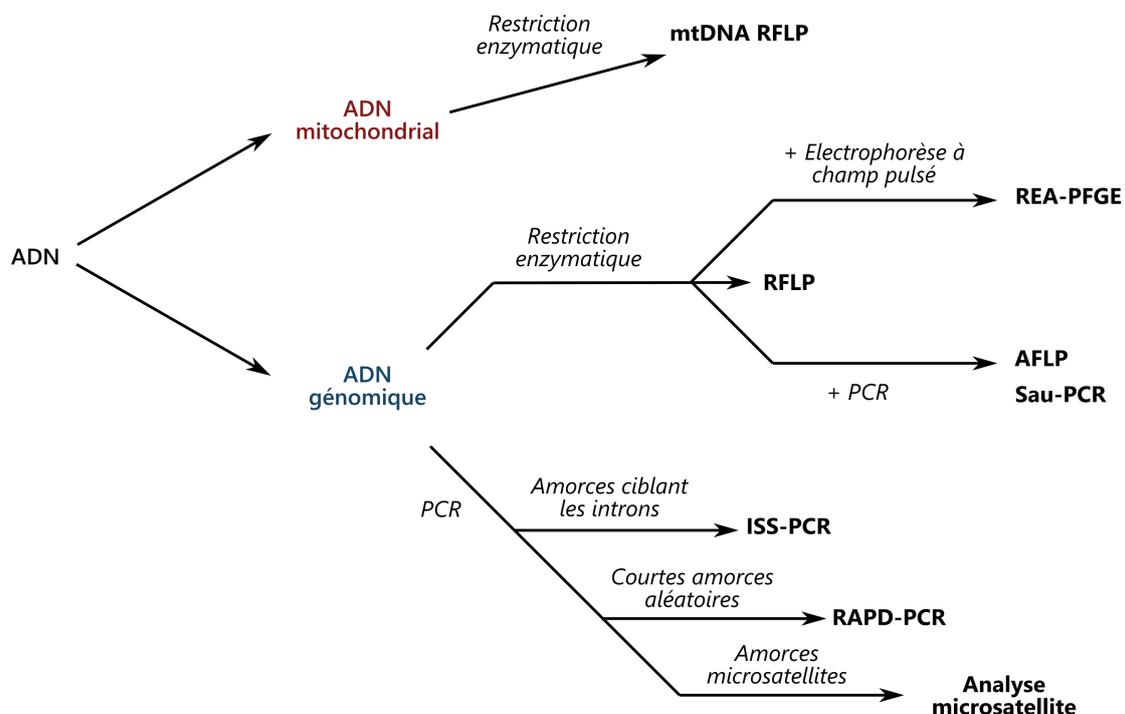


Figure 3. Exemples de méthodes moléculaires pour étudier la diversité intraspécifique chez *B. bruxellensis*.

Certaines méthodes moléculaires nécessitent l'utilisation d'enzymes de restrictions. Parmi ces dernières, on compte l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction d'ADN mitochondrial (mtDNA RFLP) qui inclut l'utilisation d'enzymes de restriction pour digérer l'ADN mitochondrial (Querol *et al.*, 1992). Bien que rapide, cette méthode est décrite comme peu discriminante si les résultats ne sont pas combinés avec ceux d'autres techniques (Agnolucci *et al.*, 2009; Ibeas *et al.*, 1996; Martorell *et al.*, 2006; Vigentini *et al.*, 2012).

La diversité intraspécifique peut être étudiée par analyse de profils de restriction par endonucléase via électrophorèse en champ pulsé (REA-PFGE). Cette technique nécessite l'utilisation d'endonucléases à coupure rare pour générer des fragments qui sont ensuite séparés par électrophorèse avec une résolution fine pour les fragments d'ADN de taille moléculaire élevée. Cette méthode est décrite comme reproductible et discriminante mais la préparation des échantillons est longue et laborieuse (Miot-Sertier and Lonvaud-Funel, 2007; Oelofse *et al.*, 2010, 2009).

Afin d'augmenter le pouvoir discriminant, d'autres méthodes combinent l'utilisation d'enzymes de restriction à l'utilisation de la PCR. C'est le cas de l'analyse du polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP). Cette méthode comprend la ligation d'adaptateurs aux fragments de restriction qui seront amplifiés par PCR (Curtin *et al.*, 2007; de Barros Lopes *et al.*, 1999). Une version simplifiée de la méthode AFLP, la Sau-PCR qui ne nécessite pas l'ajout d'adaptateurs, a également été utilisée pour étudier la diversité intraspécifique au sein de l'espèce *B. bruxellensis* (Campolongo *et al.*, 2010; Corich *et al.*, 2005; Di Toro *et al.*, 2015; Miot-Sertier and Lonvaud-Funel, 2007). Cependant, ces 2 méthodes sont décrites comme laborieuses et coûteuses (de Barros Lopes *et al.*, 1999; Giraffa and Carminati, 2008). De plus, l'utilisation d'enzymes de restriction rend difficile l'interprétation en raison du nombre élevé de bandes dans les profils et la présence d'artéfacts (Miot-Sertier and Lonvaud-Funel, 2007; Vigentini *et al.*, 2012).

Ainsi, plusieurs méthodes utilisant uniquement la PCR en délaissant les enzymes de restriction ont été développées. Parmi les régions d'intérêt du génome, la méthode ISS-PCR cible les introns, régions très variables et non essentielles pour la fonction des gènes (de Barros Lopes *et al.*, 1996). Bien que cette technique fut très efficace pour la discrimination intraspécifique chez *S. cerevisiae*, les résultats initialement obtenus chez *B. bruxellensis* n'étaient pas fiables en raison de problème de reproductibilité (Oelofse *et al.*, 2009). La technique a ensuite été améliorée en optimisant le choix des amorces, le protocole de PCR et en utilisant une électrophorèse capillaire, permettant ainsi d'augmenter le pouvoir discriminant

de la méthode et de la rendre accessible aux laboratoires (Guzzon *et al.*, 2018; Vigentini *et al.*, 2012, 2011). Une autre méthode utilisée est la RAPD-PCR, basée sur l'utilisation d'une courte amorce nucléotidique unique de séquence arbitraire qui s'hybrident à des loci distribués au hasard dans le génome (Quesada and Cenis, 1995). Cette méthode, peu coûteuse et facile d'utilisation, est très utilisée pour étudier la diversité intraspécifique chez *B. bruxellensis* (Agnolucci *et al.*, 2009; Crauwels *et al.*, 2014; Echeverrigaray *et al.*, 2013; G-Poblete *et al.*, 2020; Godoy *et al.*, 2009; Martorell *et al.*, 2006; Miot-Sertier and Lonvaud-Funel, 2007; Mitrakul *et al.*, 1999; Oro *et al.*, 2019). Le pouvoir discriminant peut être amélioré en combinant les profils individuels obtenus avec des amorces différentes (Martorell *et al.*, 2006). Cependant, cette méthode est décrite comme peu reproductible en raison de variation inter-laboratoire, un problème qui peut être minimisé en standardisant plus rigoureusement le protocole (Miot-Sertier and Lonvaud-Funel, 2007; Quesada and Cenis, 1995).

Enfin, l'analyse microsatellite, améliorée grâce à la disponibilité de séquences génomiques, est maintenant utilisée pour la discrimination intraspécifique au sein de l'espèce *B. bruxellensis* (Albertin *et al.*, 2014; Miot-Sertier and Lonvaud-Funel, 2007). Elle repose sur l'utilisation d'amorces ciblant les régions microsatellites qui sont des répétitions directes en tandem de motifs de séquence de 1 à 6 paires de bases, qui se retrouvent couramment dans les génomes des eucaryotes. Cette méthode est devenue hautement discriminante, robuste et reproductible, adaptée à l'étude de larges populations (Guichoux *et al.*, 2011). Chez l'espèce *B. bruxellensis*, elle permet de discriminer les souches en groupes génétiques (**Figure 4**), qui sont en lien avec la matrice fermentée d'origine, la ploïdie et à la résistance au SO₂ (Avramova *et al.*, 2018a, 2018b). De plus, un outil de diagnostic basé sur la technique de microsatellite, TYPEBrett, a été développé et breveté pour aider à la prédiction de la résistance au SO₂ de souches de *B. bruxellensis*.

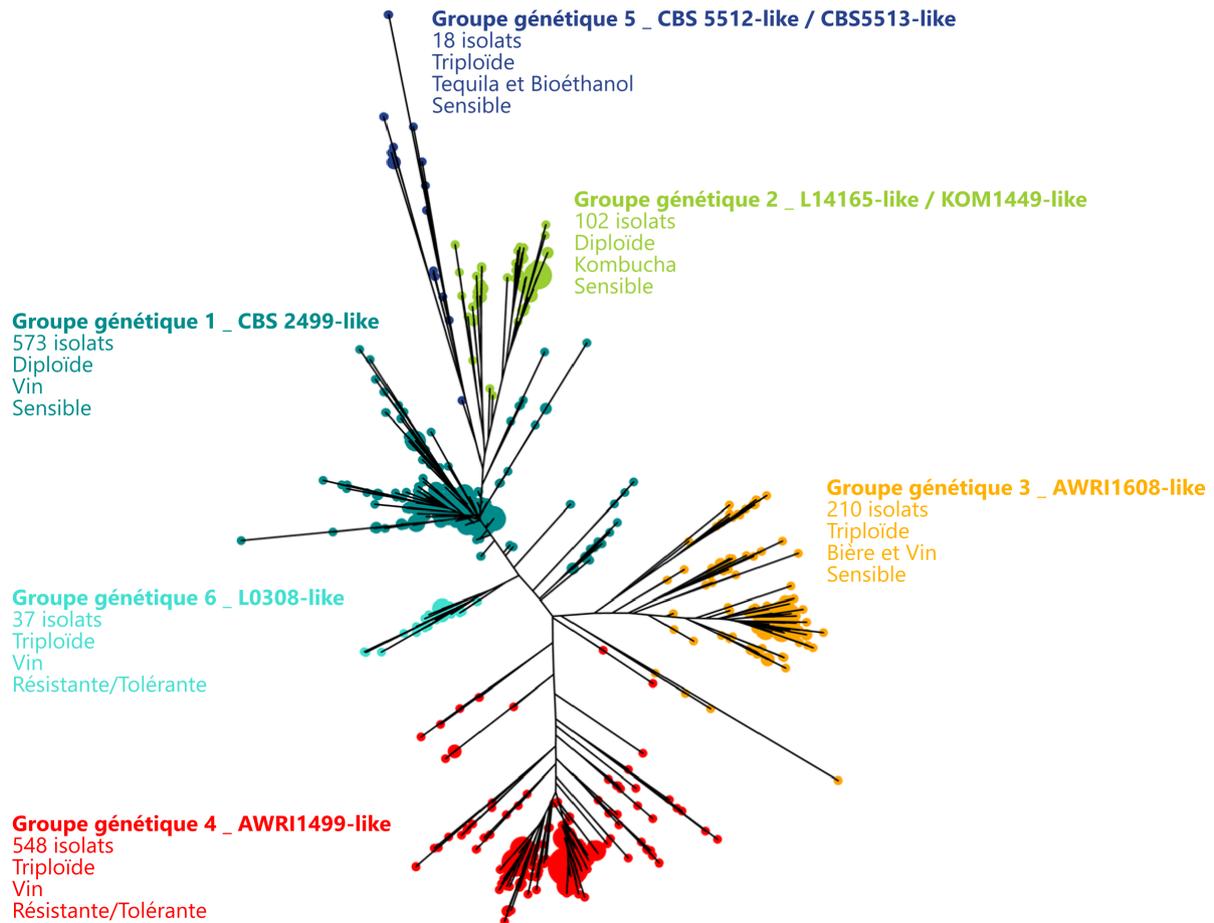


Figure 4. Dendrogramme de 1488 isolats de *B. bruxellensis* répartis dans 6 groupes génétiques représentés par différentes couleurs. Pour chaque groupe génétique est indiqué : le nombre d'isolats, la ploïdie présumée, la matrice fermentée d'isolement principal, comportement majoritaire vis à vis du SO₂. Adaptée de Avramova *et al.*, 2018a, 2018b.

2. Altérations du vin

L'élaboration du vin repose sur l'activité de différents micro-organismes, qu'ils soient indigènes ou ensemencés par l'homme. Cependant, une part des micro-organismes capables de se développer dans le vin sont délétères pour le produit fini (Conterno *et al.*, 2010). En effet, le développement (non contrôlé ou indésirable) de certains micro-organismes peut conduire à divers cas d'altération du vin (**Figure 5**).

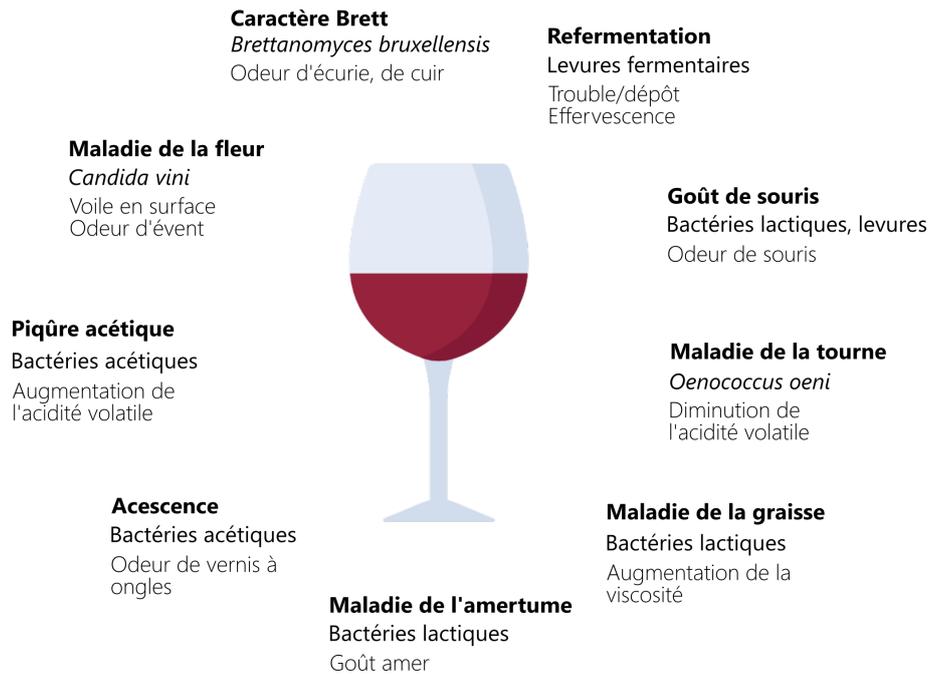


Figure 5. Exemples d'altérations du vin d'origine microbiologique. D'après Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b.

2.1. Micro-organismes d'altération

L'un des défauts importants du vin est l'augmentation de l'acidité volatile, dont le principal facteur est l'acide acétique produit lors de la croissance des bactéries acétiques (genres *Gluconobacter* et *Acetobacter*) en présence d'oxygène (Bartowsky and Henschke, 2008; Joyeux *et al.*, 1984). Les bactéries acétiques produisent également de l'acétate d'éthyle, rappelant le vernis à ongles. Les bactéries lactiques quant à elles participent à la formation du goût de souris et d'amertume (Bartowsky, 2009). Les bactéries peuvent aussi être à l'origine d'autres maladies des vins, telles que la maladie de la tourne et la maladie de la graisse (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b). Des levures (par exemple, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*, *Zygosaccharomyces bailii*) peuvent également altérer le vin, en produisant des composés indésirables ou en réalisant une refermentation non désirée en bouteille (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003; Zuehlke *et al.*, 2013). Parmi les micro-organismes ayant un potentiel d'altération, *B. bruxellensis* est considérée comme une cause majeure d'altération des vins, faisant l'objet de nombreuses revues ces deux dernières décennies (Agnolucci *et al.*, 2017; Blomqvist and Passoth, 2015; Curtin *et al.*, 2015; Curtin and Pretorius, 2014; Di Canito *et al.*, 2021; Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003; Malfeito-Ferreira, 2018; Oelofse *et al.*, 2008; Renouf *et al.*, 2007; Schifferdecker *et al.*, 2014; Smith and Divol, 2016; Steensels *et al.*, 2015; Suárez *et al.*, 2007; Tubia *et al.*, 2018b; Wedral *et al.*, 2010; Zuehlke *et al.*, 2013).

2.2. Le « caractère Brett »

La présence de *B. bruxellensis* est associée à un défaut organoleptique des vins, essentiellement des vins rouges, appelé « caractère Brett ». Ce défaut a été caractérisé par plusieurs descripteurs olfactifs comme des odeurs de cheval, écurie, cuir, médical (Chatonnet *et al.*, 1992; Licker *et al.*, 1998), et est notamment lié à la production de phénols volatils : le 4-éthylphénol et 4-éthylguaïacol. Bien qu'à faibles concentrations, ces composés puissent contribuer au profil aromatique des vins et être appréciés du consommateur, des concentrations excessives vont l'affecter négativement (seuil de préférence à 620 µg/L) et entraîner un rejet du produit par le consommateur (Alston *et al.*, 2021; Lattey *et al.*, 2010; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b; Schieber and Wüst, 2020; Wedral *et al.*, 2010).

L'étude des mécanismes de biosynthèse de ces phénols volatils chez *B. bruxellensis* met en évidence l'action séquentielle de deux enzymes à travers la transformation des acides hydroxycinnamiques (**Figure 6**). Ces précurseurs sont situés dans les vacuoles des cellules de la peau et de la pulpe des baies de raisin, principalement liés sous forme d'esters (acides *p*-coutarique, acide fertarique et acide caftarique) (Conde *et al.*, 2007). Pendant la fermentation du vin, les esters d'acides hydroxycinnamiques peuvent être hydrolysés en des formes non estérifiées (respectivement acide *p*-coumarique, acide férulique et acide caféique) en concentrations variables selon le cépage, le millésime, les conditions de vinification et les micro-organismes présents (García-Falcón *et al.*, 2007; Ginjom *et al.*, 2011; Schopp *et al.*, 2013). Cette étape, qui n'est pas réalisée chez *B. bruxellensis*, peut être menée par certaines souches de *Oenococcus oeni* présentant une activité cinnamyl-estérase (Chescheir *et al.*, 2015; Madsen *et al.*, 2017). Plusieurs études ont montré que les acides hydroxycinnamiques non estérifiés peuvent présenter une activité antimicrobienne contre *B. bruxellensis* et d'autres levures (Harris *et al.*, 2010, 2008; Pastorkova *et al.*, 2013; Sabel *et al.*, 2017). Ainsi, une étude suggère que cette caractéristique, associée à un ratio forme estérifiée / forme non estérifiée et une concentration totale variable entre les vins, pourrait en partie expliquer les différences de susceptibilité des vins à l'altération par *B. bruxellensis* (Nunes de Lima *et al.*, 2021).

Les acides hydroxycinnamiques non estérifiés vont être décarboxylés par l'hydroxycinnamate décarboxylase en composés vinyloxy. Ces composés intermédiaires résultants sont ensuite réduits grâce à l'activité de la vinylphénol réductase, pour produire les phénols volatils (**Figure 6**) (Chatonnet *et al.*, 1992; Steensels *et al.*, 2015; Suárez *et al.*, 2007).

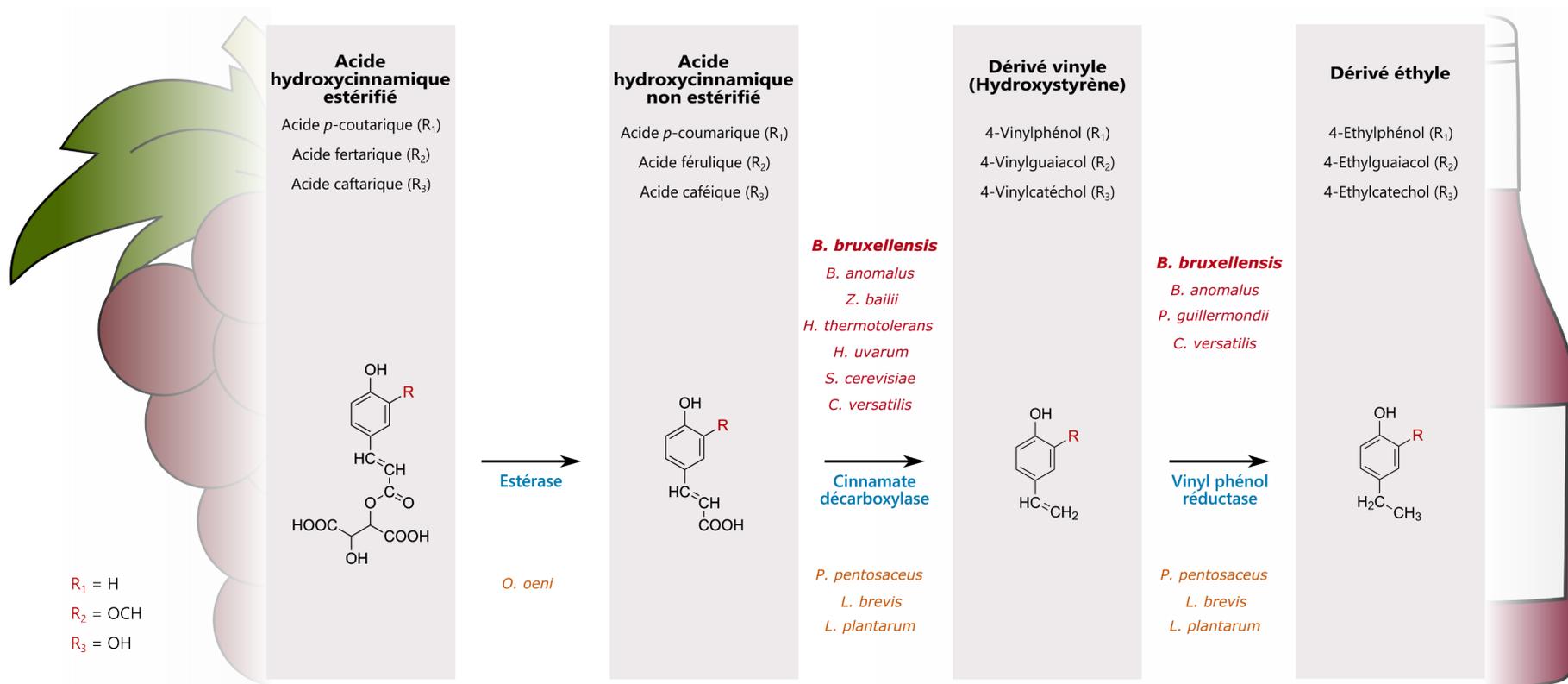


Figure 6. Micro-organismes impliqués dans la formation des phénols volatils dans le vin. Les noms de levures sont indiqués en rouge et ceux de bactéries en orange. Adaptée de Steensels *et al.*, 2015.

Les 2 enzymes nécessaires à la transformation des acides hydroxycinnamiques en phénols volatils ont été identifiées chez *B. bruxellensis* (Godoy *et al.*, 2014, 2008; Granato *et al.*, 2015; Romano *et al.*, 2017; Sangorrín *et al.*, 2013; Tchobanov *et al.*, 2008; Vanbeneden *et al.*, 2008). Il est à noter que toutes les souches ne montrent pas une activité vinylphénol réductase (Godoy *et al.*, 2009). Cette particularité peut en partie expliquer les différences de production de phénols volatils entre les souches de *B. bruxellensis* (Conterno *et al.*, 2006; Fugelsang and Zoecklein, 2003; Joseph *et al.*, 2013; Renouf *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2005; Vigentini *et al.*, 2008).

B. bruxellensis n'est pas la seule levure à exprimer ces enzymes et donc à produire des phénols volatils (**Figure 6**). Une hydroxycinnamique décarboxylase a été purifiée et caractérisée chez l'espèce *B. anomalus*, qui est capable de produire des phénols volatils (Dias *et al.*, 2003a; Edlin *et al.*, 1995). D'autres genres de levures peuvent produire des vinylphénols, comme *Candida versatilis*, *S. cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Z. bailii* (Chatonnet *et al.*, 1995, 1993, 1992; Dias *et al.*, 2003a). Cependant, la dernière étape (réduction des dérivés vinyles vers dérivés éthyles) est moins fréquente chez les levures, seules *C. versatilis*, *Pichia guilliermondii* ont montré la capacité à produire des éthylphénols, en plus de *B. bruxellensis* et *B. anomalus* (Dias *et al.*, 2003a; Lopes *et al.*, 2009; Sangorrín *et al.*, 2013). Concernant les bactéries, certaines souches de *Pediococcus pentosaceus*, *Lactiplantibacillus plantarum* (anciennement *Lactobacillus plantarum*), *Levilactobacillus brevis* (anciennement *Lactobacillus brevis*) peuvent de façon limitée métaboliser les acides *p*-coumarique et férulique en dérivés vinyles puis éthyles (Chatonnet *et al.*, 1995, 1992).

Malgré tout, *B. bruxellensis* est le seul micro-organisme du vin à produire une grande quantité de phénols volatils, faisant d'elle l'acteur majoritairement responsable du défaut organoleptique associé aux phénols volatils (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b).

2.3. Autres composés produits par *B. bruxellensis*

En plus des phénols volatils, *B. bruxellensis* produit d'autres composés qui peuvent affecter le profil aromatique du vin voire la conformité du produit fini (Oelofse *et al.*, 2008; Steensels *et al.*, 2015; Suárez *et al.*, 2007). *B. bruxellensis* participe au goût de souris, notamment par la production de 2-acétyltétrahydropyridine (ATHP) (Grbin and Henschke, 2000; Peynaud and Domercq, 1956; Romano *et al.*, 2008; Snowdon *et al.*, 2006). De plus, la production d'acides gras volatiles tels que l'acide isovalérique, associé à l'arôme « rance », a été observée chez *B. bruxellensis*. Ces composés semblent également avoir un impact sur la perception des phénols

volatils dans le cadre du « caractère Brett » (Blomqvist and Passoth, 2015; Joseph *et al.*, 2013; Licker *et al.*, 1998; Oelofse *et al.*, 2008). *B. bruxellensis* joue aussi un rôle dans l'acidité volatile de par sa production d'acide acétique, stimulée par la présence d'oxygène (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2003; Castro-Martinez *et al.*, 2005; Joseph *et al.*, 2013; Rozpędowska *et al.*, 2011). Enfin, il a été montré que *B. bruxellensis* pouvait produire des amines biogènes telles que la putrescine, la cadaverine, la spermidine, la 2-phenylethylamine. Ces composés sont connus pour avoir à fortes concentrations des effets indésirables sur la santé, puisqu'ils peuvent être responsables de réactions allergiques, de migraines ou de crises d'hypertension (Caruso *et al.*, 2002; Granchi *et al.*, 2005; Vigentini *et al.*, 2008).

2.4. Présence et développement de *B. bruxellensis* lors de la vinification

Préserver un vin d'une contamination par *B. bruxellensis* est d'autant plus difficile que cette levure est présente tout au long du procédé de vinification, de la baie au produit fini. Il est donc primordial d'avoir conscience des points critiques de contamination pour les éviter.

Tout d'abord, la détection de *B. bruxellensis* sur les baies de raisins se révèle faible, probablement à cause de son faible taux de croissance, sa capacité à entrer en état Viable mais Non Cultivable (VNC) et sa faible proportion par rapport aux autres espèces (Oro *et al.*, 2019). Néanmoins, la présence de *B. bruxellensis* à la surface des baies a pu être mise en évidence grâce à l'utilisation de milieux spécifiques d'enrichissement et de sélection (Garijo *et al.*, 2015; Oro *et al.*, 2019; Renouf and Lonvaud-Funel, 2007). Il a été suggéré que la présence de *B. bruxellensis* sur les baies pouvait être influencée par le cépage (Oro *et al.*, 2019), déjà décrit pour être corrélé à la diversité du microbiome levurien (Cordero-Bueso *et al.*, 2011).

La levure *B. bruxellensis* peut également s'établir dans la cuverie et la cave. En plus d'avoir été révélée dans l'air (Connell *et al.*, 2002), la présence de *B. bruxellensis* a été mise en évidence sur plusieurs surfaces du matériel vinaire, comme les robinets, tuyaux, pipettes, seaux, cuves de transfert (Abdo, 2020; Oro *et al.*, 2019; Smith and Divol, 2016). Concernant les fûts, cette levure a été isolée à la fois à l'extérieur et à l'intérieur, à une profondeur pouvant aller jusqu'à 8 mm (**Figure 7**) (Abdo, 2020; Barata *et al.*, 2013; Cartwright *et al.*, 2018; González-Arenzana *et al.*, 2013). Toutes ces surfaces représentent des environnements dans lesquels *B. bruxellensis* peut adhérer et persister au cours du temps. Ainsi, ces réservoirs sont de potentielles sources de contamination du vin, soit par contact direct avec la matrice, soit par transfert à travers l'activité humaine ou les insectes comme les drosophiles (Abdo *et al.*, 2020; Lam and Howell, 2015; Martorell *et al.*, 2006).

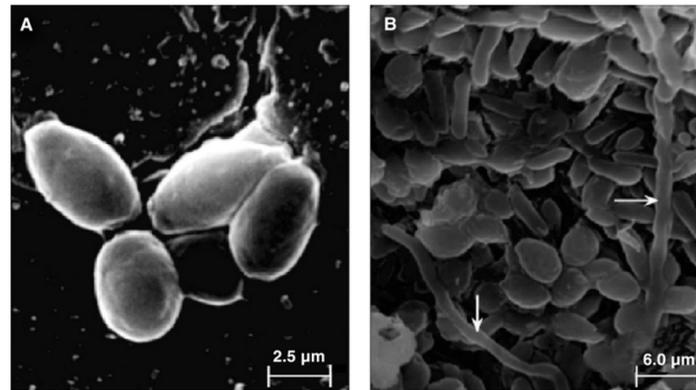


Figure 7. Observation au microscope électronique à balayage de fûts infectés par *Brettanomyces bruxellensis*, (A) illustrant des cellules localisées à plusieurs millimètres de profondeur et (B) la présence de filaments indiqués par des flèches (Cartwright *et al.*, 2018).

Même si *B. bruxellensis* peut être retrouvée dès le début de la vinification, sa présence minoritaire dans le moût et son faible taux de croissance ne lui permettent pas de prendre le pas sur les autres levures (Licker *et al.*, 1998; Renouf *et al.*, 2009; Suárez *et al.*, 2007). Capable de persister pendant les fermentations alcoolique (FA) et malolactique (FML) (Renouf *et al.*, 2009), *B. bruxellensis* profite davantage de la baisse d'activité microbienne pour se développer. Ainsi, plusieurs étapes au cours de la vinification sont favorables au développement de *B. bruxellensis* (**Figure 8**), se révélant ainsi critiques pour le vinificateur (Wedral *et al.*, 2010). Dans les cas d'une FA languissante ou arrêtée, d'intervalle de temps important entre la FA et la FML ou de retard dans le démarrage de la FML, la population levurienne décline, laissant l'opportunité à *B. bruxellensis* de se développer et de potentiellement s'implanter comme une espèce majoritaire (Nardi *et al.*, 2010; Renouf *et al.*, 2006). L'élevage, qui fait suite à la FML, est une étape caractérisée par une activité microbienne très faible et représente également un moment propice au développement de *B. bruxellensis*. Les cellules peuvent se nicher dans les pores du bois, leur assurant une protection contre le SO₂ et leur permettant de se développer à partir des nutriments restants (Barata *et al.*, 2013; Chatonnet *et al.*, 1995, 1992; Renouf *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2015; Suárez *et al.*, 2007). Par ailleurs, *B. bruxellensis* est capable d'utiliser le cellobiose issu du bois comme source de carbone, grâce à une activité β -glucosidase (Moon *et al.*, 2001; Steensels *et al.*, 2015). Ainsi, *B. bruxellensis* peut être retrouvée en bouteille (Coulon *et al.*, 2010; Rubio *et al.*, 2015; Suárez *et al.*, 2007).

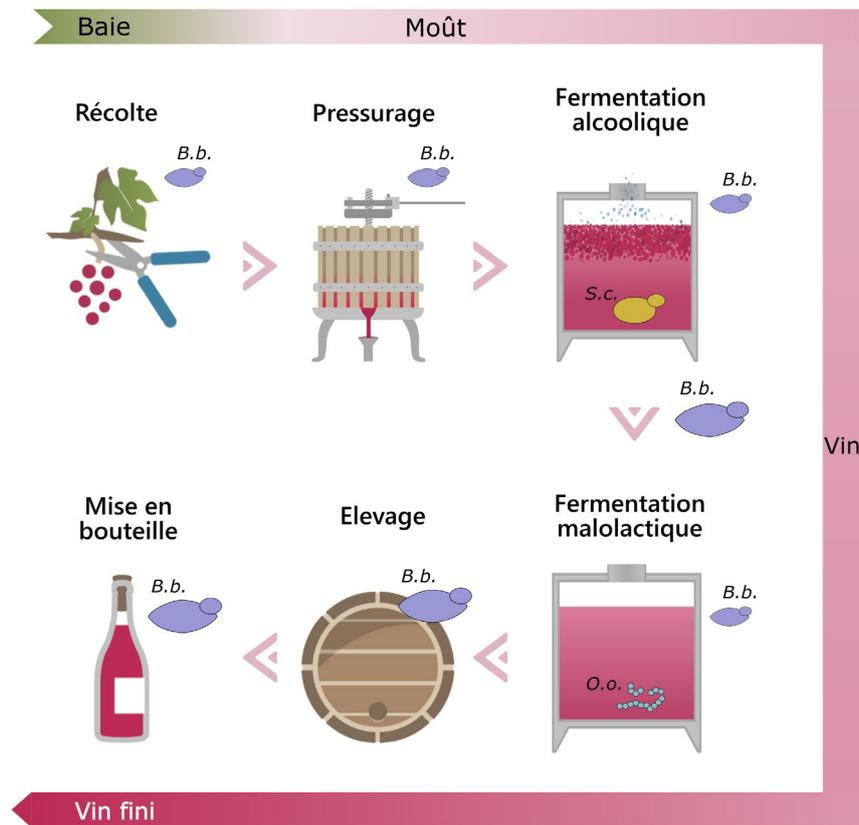


Figure 8. Etapes de la vinification favorables au développement de *Brettanomyces bruxellensis*. B.b. : *Brettanomyces bruxellensis* ; O.o. : *Oenococcus oeni* ; S.c. : *Saccharomyces cerevisiae*. D'après Oelofse *et al.*, 2008; Oro *et al.*, 2019 et Suárez *et al.*, 2007.

3. Besoins nutritionnels de *B. bruxellensis*

B. bruxellensis est particulièrement bien adaptée aux conditions post-fermentaires, dans lesquelles les autres levures ne sont pas aptes à survivre. Cette capacité peut être notamment expliquée par ses très faibles exigences nutritionnelles et la large variété de nutriments qu'elle peut utiliser (Smith and Divol, 2016). Cette levure peut ainsi profiter des nutriments présents non utilisés par les autres populations dans le milieu et ceux issus de la lyse des cellules.

3.1. Sources carbonées

B. bruxellensis est capable d'utiliser un large éventail de sources de carbone pour se développer (**Tableau 1**). Plusieurs études ont mis en évidence sa capacité à croître suite à la consommation de monosaccharides comme le glucose, le fructose, le galactose, le mannose, l'arabinose ou encore le ribose (Blondin *et al.*, 1982; Cibrario *et al.*, 2020; Galafassi *et al.*, 2011). Certaines souches peuvent également métaboliser des polysaccharides pour s'en servir comme sources de carbone (cellobiose, lactose, maltose, raffinose, saccharose, tréhalose) (Blomqvist *et al.*, 2010; Cibrario *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2001). D'autres substrats tels

que des polyols (adonitol, glycérol, mannitol, sorbitol) et des acides organiques (acétate, citrate, lactate, malate, succinate) peuvent être utilisés comme sources de carbone par *B. bruxellensis* (Conterno *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2003b; Vigentini *et al.*, 2008; Wijsman *et al.*, 1984). Elle peut notamment utiliser l'éthanol grâce à la respiration cellulaire, nécessitant par conséquent la présence d'oxygène pour son oxydation (Silva *et al.*, 2004; Smith and Divol, 2018). Il est important de noter que la capacité de *B. bruxellensis* à utiliser cette gamme de sources de carbone est largement dépendante de la souche (Cibrario *et al.*, 2020; Conterno *et al.*, 2006; Galafassi *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2001).

Tableau 1. Exemples de sources de carbone utilisées par *Brettanomyces bruxellensis* pour sa croissance. Vert = Source utilisée ; Hachuré = utilisation souche dépendante ; Blanc = source non utilisée. Références : 1 = Wijsman *et al.*, 1984 ; 2 = Dias *et al.*, 2003b ; 3 = Smith and Divol, 2018; 4 = Conterno *et al.*, 2006; 5 = Vigentini *et al.*, 2008; 6 = Blondin *et al.*, 1982; 7 = Galafassi *et al.*, 2011; 8 = Rodrigues *et al.*, 2001; 9 = Blomqvist *et al.*, 2010; 10 = Cibrario *et al.*, 2020; 11 = Silva *et al.*, 2004, 12 = Echeverrigaray *et al.*, 2013.

Composé	Croissance	Référence	Composé	Croissance	Référence
Acétate	Vert	1, 2, 3	Mannitol	Hachuré	4, 10
Glucose	Vert	1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12	Mannose	Hachuré	3, 7, 10
Adonitol	Hachuré	4	Raffinose	Hachuré	4, 12
Amidon	Hachuré	4, 7	Ribose	Hachuré	10
Arabinose	Hachuré	4, 7, 10	Saccharose	Hachuré	4, 7, 8, 10, 12
Cellobiose	Hachuré	4, 6, 7, 10, 12	Sorbitol	Hachuré	10
Citrate	Hachuré	4	Succinate	Hachuré	4
Ethanol	Hachuré	2, 3, 4, 6, 8, 11	Tréhalose	Hachuré	4, 10, 12
Fructose	Hachuré	5, 10	Agar	Hachuré	7
Galactose	Hachuré	4, 7, 10, 12	Cellulose	Hachuré	4
Glycérol	Hachuré	3, 4, 12	Mélibiose	Hachuré	10
Lactate	Hachuré	4, 5	Rhamnose	Hachuré	10
Lactose	Hachuré	4, 10	Tartrate	Hachuré	4
Malate	Hachuré	3, 4	Xylitol	Hachuré	7
Maltose	Hachuré	4, 7, 8, 9, 10, 12	Xylose	Hachuré	7, 10, 12

Cependant, les conclusions peuvent diverger entre les études, à cause de la diversité intraspécifique mais également des nombreux protocoles utilisés. En effet, plusieurs aspects peuvent varier entre les études comme la composition des milieux utilisés (composition de base, présence ou absence du composé, isomère, concentration) et les conditions de croissance (oxygène, temps d'incubation) (Smith and Divol, 2018). De plus, des résultats différents peuvent être obtenus selon les méthodes utilisées. Les études citées ci-dessus se basent sur la croissance des cellules pour conclure à l'utilisation d'une source de carbone. Récemment, l'utilisation d'un système Phenotype Microarray (Biolog) a permis de tester près de 180 substrats (92 résultats positifs) et a fourni des informations sur l'utilisation de nouvelles sources

de carbone par *B. bruxellensis* (**Annexe 1**) (Cibrario, 2017; Crauwels *et al.*, 2015). Cependant, ce système est basé sur la capacité des cellules à oxyder le substrat, mettant en évidence la respiration cellulaire. Il faut donc rester prudent et considérer ce système comme un outil comparatif en vue de tests physiologiques classiques pour confirmation. Effectivement, des résultats faux positifs peuvent émerger, dans les cas où les cellules survivent et respirent grâce à leurs réserves intracellulaires sans utiliser les substrats testés et/ou utilisent le substrat testé sans pour autant croître (Cibrario, 2017).

3.2. Sources d'azote

Les besoins en azote de *B. bruxellensis* sont faibles et un enrichissement du vin par un élevage sur lies suffit à favoriser son développement (Guilloux-Bénatier *et al.*, 2001).

L'ammonium peut être utilisé comme seule source d'azote par *B. bruxellensis* (de Barros Pita *et al.*, 2013b) et il a été montré qu'une concentration supérieure à 2g/L de sulfate d'ammonium pouvait inhiber la croissance de la levure (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000). Certaines souches peuvent utiliser le nitrate comme source d'azote inorganique (Conterno *et al.*, 2006) contrairement à *S. cerevisiae* (de Barros Pita *et al.*, 2011). Ainsi, bien que l'utilisation de nitrate par rapport à l'ammonium entraîne une diminution de la consommation des sucres et la production d'éthanol, cette capacité d'assimilation du nitrate confère un avantage certain à *B. bruxellensis* vis-à-vis des levures qui ne le consomment pas (de Barros Pita *et al.*, 2013b, 2011). Concernant les acides aminés, une étude récente a mis en évidence la préférence de *B. bruxellensis* pour chaque acide aminé en présence ou non d'oxygène (Parente *et al.*, 2018). La glutamine est une source d'azote préférée par *B. bruxellensis*, alors que la majorité des autres acides aminés sont considérés comme peu utilisables, indépendamment de l'oxygène (**Tableau 2**). L'utilisation sélective des sources préférées est possible notamment grâce à un mécanisme de régulation appelé répression catabolique azotée (NCR), qui empêche l'absorption de sources d'azote non préférentielles si de meilleures sources sont disponibles (de Barros Pita *et al.*, 2013a). Il est suggéré que *B. bruxellensis* puisse mettre en place un autre mécanisme pour assurer une croissance en anaérobiose en consommant des sources dites « non préférentielles » en aérobiose, telles que l'aspartate et le glutamate (Parente *et al.*, 2018).

De même que pour les sources de carbone, le système Phenotype Microarray a permis de tester 95 source d'azote dont 71 résultats positifs, fournissant des informations sur l'utilisation de potentielles nouvelles sources d'azote par *B. bruxellensis* pour sa croissance (**Annexe 2**) (Crauwels *et al.*, 2015).

Tableau 2. Classification des acides aminés selon leur potentiel pour stimuler la croissance de *Brettanomyces bruxellensis* en aérobiose ou en anaérobiose. Adapté de Parente *et al.*, 2018.

Condition	Catégories				
	Préférentielle	Secondaire	Peu utilisable		
Aérobiose	Glutamine	Arginine	Alanine	Isoleucine	Sérine
		Aspartate	Asparagine	Lysine	Tryptophane
		Glutamate	Cystéine	Méthionine	Tyrosine
		Leucine	Glycine	Phénylalanine	Valine
		Thréonine	Histidine	Proline	
Anaérobiose	Aspartate	Alanine	Cystéine	Lysine	Tyrosine
	Glutamate	Arginine	Glycine	Méthionine	Valine
	Glutamine	Asparagine	Histidine	Proline	
		Phénylalanine	Isoleucine	Thréonine	
		Sérine	Leucine	Tryptophane	

3.3. Autres éléments

Contrairement au carbone et à l'azote, peu de travaux ont concerné les besoins en vitamines de *B. bruxellensis*. Les conclusions sont diverses et parfois contradictoires, notamment en raison d'une forte variabilité entre les souches (Evers *et al.*, 2021; von Cosmos and Edwards, 2016). Néanmoins, il ressort que la croissance de *B. bruxellensis* ne semble pas affectée par l'absence de plusieurs vitamines, telles que l'acide folique (B9), l'acide nicotinique (B3), l'acide pantothénique (B5) la riboflavine (B2) ou la pyridoxine (B6) (von Cosmos and Edwards, 2016). Quant à la thiamine (B1), ses besoins dépendent de la présence ou non d'éthanol. Enfin, la biotine (B8) est la vitamine qui affecte le plus la croissance de *B. bruxellensis* (Barnett *et al.*, 1990; Conterno *et al.*, 2006; von Cosmos and Edwards, 2016). Les vitamines, majoritairement présentes dans le moût, sont largement consommées par les levures lors de la FA. Ainsi dans le vin fini, seuls des traces de vitamines sont retrouvées selon le composé considéré (Evers *et al.*, 2021).

B. bruxellensis présente également de faibles exigences en phosphate et en oligo-éléments puisque leurs concentrations dans l'extrait de levure, composant de nombreux milieux de culture, semblent suffisantes pour combler ses besoins nutritionnels (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000).

4. Métabolisme et croissance de *B. bruxellensis*

Les différentes sources de nutriments empruntent des voies métaboliques différentes. L'état actuel des connaissances est résumé dans la **Figure 9**.

4.1. Métabolisme respiratoire et fermentaire

L'oxygène est un facteur important pour le développement de *B. bruxellensis*. La présence d'oxygène va stimuler sa croissance, mais cela ne signifie pas que sans oxygène, il n'y a pas de croissance. En effet, *B. bruxellensis* est une levure anaérobie facultative (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2003). Pour sa croissance, la levure va utiliser les sucres présents dans le milieu en les métabolisant en pyruvate par la voie de la glycolyse.

En condition d'aérobiose, le métabolisme respiratoire est mis en place. Pour cela, le pyruvate va entrer dans le cycle de Krebs. Les cofacteurs produits lors de la glycolyse et le cycle de Krebs peuvent alors être réoxydés par la chaîne respiratoire avec production d'ATP.

En absence d'oxygène, la levure peut utiliser le métabolisme fermentaire pour produire de l'énergie. Ainsi, le pyruvate est décarboxylé en acétaldéhyde puis réduit en éthanol ce qui permet la réoxydation des cofacteurs réduits.

4.2. Effet Crabtree

En présence d'une forte concentration en sucre, même si l'oxygène est disponible en quantité suffisante, *B. bruxellensis* peut, comme *S. cerevisiae*, adopter un métabolisme fermentaire plutôt que respiratoire : c'est l'effet Crabtree (Rozpędowska *et al.*, 2011). Cette stratégie permet à la levure de produire de l'éthanol, rendant ainsi l'environnement toxique pour beaucoup d'autres micro-organismes. Ensuite, l'éthanol produit pourra être consommé par le métabolisme respiratoire lorsque le glucose ne sera plus présent dans l'environnement (De Deken, 1966; Piškur *et al.*, 2006).

4.3. Effet Custer

Contrairement à *S. cerevisiae*, *B. bruxellensis* est sensible à l'effet Custer : la fermentation du glucose en éthanol est plus rapide en présence d'oxygène qu'en anaérobiose (Scheffers, 1961; Wikén *et al.*, 1961). Ce phénomène semblerait lié à l'incapacité de *B. bruxellensis* à restaurer ou maintenir son équilibre redox interne lors de l'entrée en condition d'anaérobiose, à la différence de *S. cerevisiae* qui peut restaurer sa balance redox par la production de glycérol (Leite *et al.*, 2013; Wijsman *et al.*, 1984). Cette inhibition est temporaire puisque les cellules sont capables de produire à nouveau de l'éthanol après une phase de latence nécessaire à la réactivation des voies intracellulaires pour la réoxydation des co-enzymes réduits (Steensels *et al.*, 2015; Wijsman *et al.*, 1984).

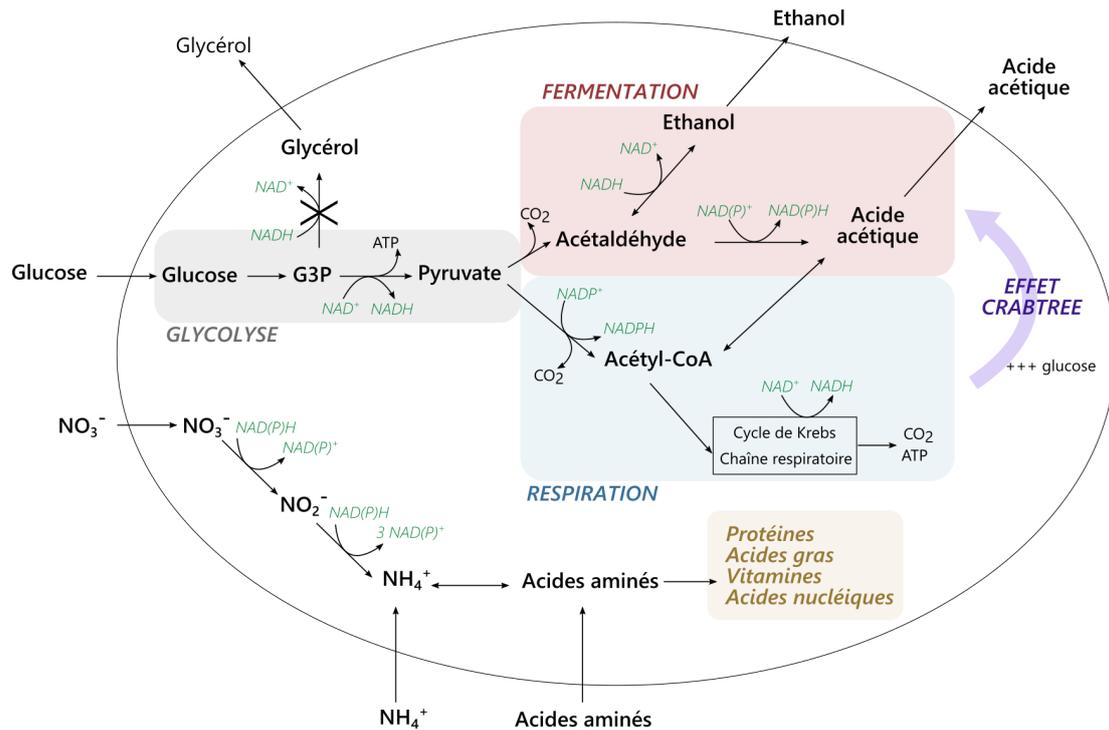


Figure 9. Représentation schématique des voies métaboliques d'utilisation des sources de carbone et d'azote chez *B. bruxellensis*. Adaptée de Smith and Divol, 2016 et Steensels *et al.*, 2015.

4.4. « Petite » mutation

B. bruxellensis est dite « petite positive » (Clark-Walker *et al.*, 1981; Procházka *et al.*, 2010). Ce phénotype, décrit chez *S. cerevisiae* également, se manifeste par l'apparition de petites colonies par rapport à des colonies « wild-type » lors de culture en aérobiose (**Figure 10**). Les petites colonies résultent d'un blocage de la chaîne respiratoire, réduisant grandement le rendement en ATP, et par conséquent la biomasse obtenue à partir d'une mole de glucose. Ces cellules sont également incapables de se développer sur des sources de carbone non fermentescibles (éthanol, glycérol) (Day, 2013). Ce phénotype résulte d'un dysfonctionnement du génome mitochondrial (par mutations ou perte du génome mitochondrial).

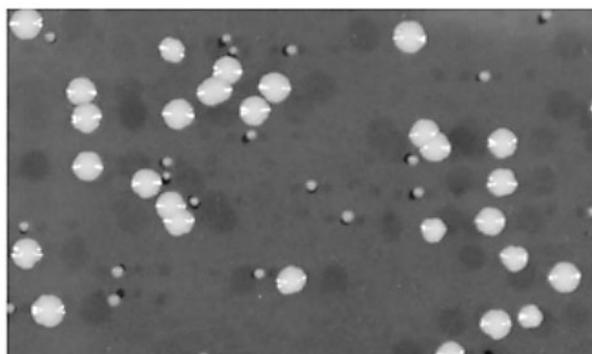


Figure 10. Apparition de petites colonies lors de la croissance de la souche de *S. cerevisiae* BY4716 sur gélose (Dimitrov *et al.*, 2009).

5. Prévenir et éliminer *B. bruxellensis*

Si *B. bruxellensis* est impliqué dans l'élaboration de plusieurs boissons fermentées (production d'arômes dans certaines bières, participation active à l'élaboration du kombucha), dans le cas du vin, il est primordial d'éviter le développement de cette levure qui peut altérer le produit (Serra Colomer *et al.*, 2019; Tran *et al.*, 2020). Si les méthodes de prévention ne sont pas suffisantes pour empêcher les contaminations, des procédés peuvent être utilisés pour l'éliminer du procédé de vinification pour éviter l'altération du vin (Pinto *et al.*, 2020; Stadler and Fischer, 2020; Suárez *et al.*, 2007; Zuehlke *et al.*, 2013).

5.1. Prévenir la contamination du vin par *B. bruxellensis*

Dans le but de prévenir les contaminations par *B. bruxellensis*, l'Organisation Internationale de la Vigne et du vin a mis en place un guide des bonnes pratiques viti-vinicoles (OIV, 2014). Ces recommandations incluent notamment d'assurer une bonne hygiène lors de la vinification. Une première approche préventive s'applique au niveau des baies, consistant en une sélection des raisins sains. Il s'agit également de garantir une hygiène rigoureuse du matériel utilisé lors de la vinification. Un point critique dans la contamination par *B. bruxellensis* est l'utilisation d'un même matériel non nettoyé entre différents lots (Stadler and Fischer, 2020). Le procédé le plus couramment utilisé pour le nettoyage du matériel consiste en l'application de solutions de détergents alcalins et de solutions acides. Ensuite, différents désinfectants peuvent être appliqués pour diminuer la concentration en micro-organismes (produits chlorés, oxydants, ammoniums quaternaires ...) (IFV, 2016).

Malgré les précautions d'hygiène qui peuvent être prises, la présence de *B. bruxellensis* dans l'environnement vinicole est quasi inévitable. Il faut donc éviter la prolifération de cette levure par diverses actions. Puisque *B. bruxellensis* tire profit d'une faible activité microbienne pour se développer, il est important d'assurer une pression microbienne suffisante et réduire le temps de latence entre la FA et la FML pour minimiser le risque de développement (OIV, 2014). Ainsi, l'utilisation de « starters » (levures et/ou bactéries lactiques) pour réaliser les fermentations est un moyen de prévention particulièrement adapté (Berbegal *et al.*, 2018; Gerbaux *et al.*, 2009). De plus, le choix des souches utilisées dans ces « starters » a son importance. En effet, certaines souches de *S. cerevisiae* peuvent sécréter un peptide antimicrobien, la saccharomycine, qui exerce un effet antagoniste vis-à-vis de plusieurs levures non-*Saccharomyces*, dont *B. bruxellensis* (Branco *et al.*, 2021, 2017). Concernant les « starters » contenant des bactéries lactiques, il est conseillé d'utiliser des souches sans activité cinnamyl-

estérase, dites « phénols-négatives » (Virdis *et al.*, 2021).

D'autre part, depuis plusieurs années, des levures non-*Saccharomyces* sont commercialisées seules ou en combinaison avec *S. cerevisiae*, apportant de nombreux avantages dont le contrôle de micro-organismes indésirables dans le cadre de la bioprotection (Comitini *et al.*, 2021; Roudil *et al.*, 2020; Simonin *et al.*, 2019; Tristezza *et al.*, 2016). Parmi les souches non-*Saccharomyces* connues pour avoir une activité antagoniste, certaines sont en mesure de produire des toxines « killer » capables d'inhiber *B. bruxellensis* (**Tableau 3**) (Berbegal *et al.*, 2017; Mannazzu *et al.*, 2019). *Metschnikowia pulcherrima*, quant à elle, a été décrite pour présenter une action antimicrobienne contre *B. bruxellensis*, probablement à travers la sécrétion de l'acide pulcherrimique qui chélate le fer du milieu, le rendant indisponible pour les autres levures (Oro *et al.*, 2014; Türkel *et al.*, 2014).

Tableau 3. Exemples de toxines « killer » produites par des levures non-*Saccharomyces* contre *Brettanomyces bruxellensis* ayant une application potentielle dans l'industrie vinicole. Adapté de Berbegal *et al.*, 2018.

Micro-organismes	Toxine « killer »	Référence
<i>Candida pyralidae</i>	CpKT1, CpKT2	Mehlomakulu <i>et al.</i> , 2014
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>	Kwkt	Comitini <i>et al.</i> , 2004; Comitini and Ciani, 2011
<i>Pichia anomala</i>	Pikt	Comitini <i>et al.</i> , 2004
<i>Pichia membranifaciens</i>	PMTK2	Santos <i>et al.</i> , 2009
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	TdKT	Villalba <i>et al.</i> , 2016
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KTCf20, WA18	Comitini <i>et al.</i> , 2020; Fernández de Ullivarri <i>et al.</i> , 2018

En parallèle, il est recommandé d'effectuer régulièrement des analyses microbiologiques afin de détecter de potentielles contaminations par *B. bruxellensis* (**Tableau 4**) (Tubia *et al.*, 2018b). Les méthodes classiques de détection de *B. bruxellensis* consistent en l'utilisation de milieux de croissance sélectifs, qui mettent en évidence des traits spécifiques de cette espèce : acidification (virage de l'indicateur coloré), synthèse de phénols volatils (odeur caractéristique) ou bien résistance à la actidione/cycloheximide (Gerbaux *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2001). Bien que simples et peu coûteuses, les méthodes classiques ne permettent de détecter que les cellules viables et cultivables, excluant ainsi des cellules métaboliquement actives mais incapables de croître sur milieux de croissance (état VNC). De plus, le délai pour obtenir un résultat est bien souvent trop long (supérieur à 1 semaine) pour permettre aux vinificateurs d'être suffisamment réactifs en cas de contamination critique. D'autres techniques sont basées sur l'amplification d'ADN ou d'ARN et permettent de détecter *B. bruxellensis*, vivantes ou non

(Longin *et al.*, 2016b). Ces méthodes moléculaires sont sensibles et rapides mais nécessitent des équipements et du personnel spécialisés. Enfin, la méthode de cytométrie en flux couplée à l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) (Longin, 2017; Serpaggi *et al.*, 2010) peut être utilisée pour détecter *B. bruxellensis*. Cette méthode permet de détecter une population de *B. bruxellensis* de 3×10^2 cellules/mL avec un résultat en 48 heures, et d'apporter des informations sur la viabilité des cellules. Il existe également la méthode CYTO-3D, récemment développée (Cofrac, accréditation n°1-0207).

Tableau 4. Principales méthodes utilisées pour la détection de *Brettanomyces bruxellensis*. Adapté de Tubia *et al.*, 2018b.

Méthode	Exemples	Avantages	Inconvénients
Milieux de croissance sélectifs	Milieux DBDM, DHSA, WLD	Simple, peu coûteux, quantitatifs	Manque de spécificité, long, sous-estimation (VNC non détectée)
Biologie moléculaire	RT-PCR, qPCR	Rapide, sensible, fiable, détection des cellules VBNC	Coût plus élevé, nécessite matériel/personnel spécialisés, sur-estimation (incluant populations mortes)
Cytométrie en flux	Couplée à FISH, Cyto 3D	Simple, rapide	Coût plus élevé, nécessite matériel/équipe spécialisés

Par ailleurs, au cours des fermentations, les températures et le sulfitage sont des facteurs importants à maîtriser pour limiter les contaminations (OIV, 2014). Le sulfitage, qui consiste en l'ajout de dioxyde de soufre (SO₂), est la méthode de contrôle la plus utilisée et la plus efficace pour éviter les contaminations microbiennes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012a). De nombreux travaux ont étudié l'impact du SO₂ sur *B. bruxellensis* et démontré son effet antimicrobien (Agnolucci *et al.*, 2014, 2010; Avramova *et al.*, 2018b; du Toit *et al.*, 2005; G-Poblete *et al.*, 2020; Longin *et al.*, 2016a; Louw *et al.*, 2016; Vigentini *et al.*, 2013; Zuehlke and Edwards, 2013). Parmi la totalité du SO₂ ajouté dans le vin, seule la fraction de SO₂ dit actif ou moléculaire (H₂SO₃) présente des propriétés antiseptiques (**Figure 11**). La quantité de SO₂ moléculaire dépend de la matrice vinaire ainsi que de différents facteurs : la quantité de SO₂ moléculaire diminue lorsque le pH augmente, la température diminue ou le titre alcoométrique augmente (Divol *et al.*, 2012; Sturm *et al.*, 2014; Zuehlke and Edwards, 2013). Ainsi, il est nécessaire de contrôler et ajuster le niveau de SO₂ moléculaire au cours de la vinification, jusqu'à l'élevage, pour prévenir le développement de *B. bruxellensis*.

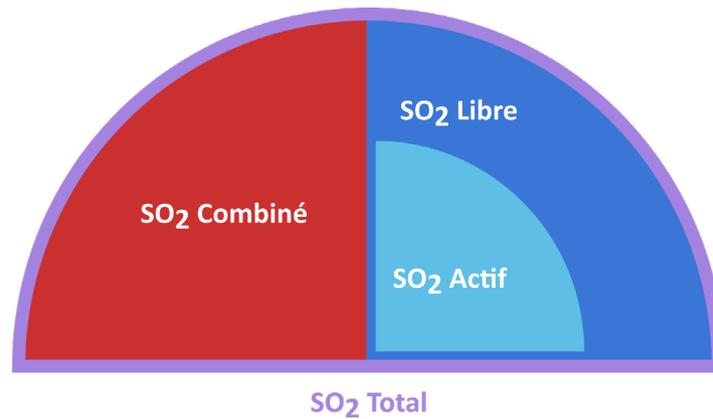


Figure 11. Les différentes formes de SO₂ retrouvées dans le vin.

L'Union Européenne impose un étiquetage comprenant la mention « contient des sulfites » lorsque la concentration totale en SO₂ dépasse 10 mg/L (directive 2003/89/CE). Au cours de la dernière décennie, des préoccupations concernant les effets indésirables des sulfites sur la santé (migraines, allergies ...) ont été décrites (Vally *et al.*, 2009). De plus, la demande des consommateurs s'oriente de plus en plus vers des produits « sains » exempts d'intrants chimiques, notamment vers des vins issus de l'agriculture biologique ou des vins naturels. Aujourd'hui donc, la tendance est à la diminution de l'utilisation des sulfites en vinification (Lisanti *et al.*, 2019). Cependant, cette évolution dans les pratiques œnologiques rend la gestion de contamination par *B. bruxellensis* plus ardue dans un contexte de changement climatique entraînant une augmentation potentielle du pH des vins (et donc une diminution de la part de SO₂ moléculaire).

5.2. Eliminer *B. bruxellensis*

Malgré les précautions prises tout au long de la vinification, des contaminations par *B. bruxellensis* peuvent survenir. Des traitements curatifs doivent alors être appliqués pour éliminer les populations de *B. bruxellensis* et éviter la production de phénols volatils qui altéreraient le produit.

Le SO₂ peut être utilisé en traitement curatif si une contamination survient, au cours de la vinification ou l'élevage. Cependant, la tolérance de certaines souches requiert d'ajuster les doses de SO₂ (Avramova *et al.*, 2018b; Longin *et al.*, 2016a), qui ne sont néanmoins pas toujours suffisantes face à des souches résistantes. Ainsi, en raison de ce phénotype de résistance ajouté à certaines pratiques œnologiques visant à minimiser l'utilisation des sulfites, la recherche s'est fortement orientée vers l'étude de solutions alternatives (Lisanti *et al.*, 2019). Il faut noter néanmoins qu'à l'heure actuelle, aucune n'est en mesure de remplacer totalement le SO₂, qui

reste un additif incontournable en œnologie de par son large spectre d'action, comprenant en plus de ses propriétés antiseptiques, des propriétés antioxydante et antioxydasique (OIV, 2020). Actuellement, plusieurs technologies sont proposées pour faire face aux contaminations par *B. bruxellensis*, dans le vin et sur le matériel vinaire (Morata *et al.*, 2017; Pinto *et al.*, 2020; Suárez *et al.*, 2007). Des exemples sont décrits ci-dessous.

Le règlement de l'Union Européenne (Reg. EC No. 606/2209) autorise l'utilisation de plusieurs méthodes chimiques, également approuvées par l'OIV. Le chitosane, un agent antiseptique à large spectre dérivé de la chitine, est autorisé par l'Union Européenne depuis 2011 à une dose maximale de 10 g/hL, mais recommandé à 4 g/hL. Il permet d'inhiber la croissance de *B. bruxellensis* bien qu'une reprise de croissance soit possible plusieurs jours ou mois après le traitement (Ferreira *et al.*, 2013; Paulin *et al.*, 2020; Petrova *et al.*, 2016).

Le dicarbonate de diméthyle (DMDC) est un composé capable d'inhiber la croissance de levures indésirables, dont *B. bruxellensis*. Dans l'Union Européenne, ce produit est autorisé (maximum 200 mg/L) dans les vins à plus de 5 g/L de sucre résiduel avant l'embouteillage. Cependant, son action dépend de la concentration cellulaire initiale puisque la dose maximale autorisée n'est pas totalement efficace contre des populations de 10^6 UFC/mL d'espèces levuriennes résistantes (Costa *et al.*, 2008; Delfini *et al.*, 2002). En revanche, combinée avec du SO₂, l'effet antimicrobien du DMDC augmente nettement, permettant ainsi de réduire les doses de SO₂ (Costa *et al.*, 2008).

Des méthodes physiques peuvent également être utilisées. Comparées aux additifs chimiques, l'utilisation de telles méthodes correspond davantage à l'exigence de réduire les intrants chimiques dans le vin. La filtration sur membrane est largement utilisée pour l'élimination des micro-organismes, dont *B. bruxellensis* (Umiker *et al.*, 2013). Cependant, des cellules en état VNC semblent capables de passer au travers des membranes, imposant d'utiliser des filtres plus fins qui peuvent avoir un impact négatif sur la couleur et le profil aromatique du vin (Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Serpaggi *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2007).

L'application de hautes pressions peut permettre d'éliminer des micro-organismes sans engendrer des altérations majeures des propriétés physicochimiques ou sensorielles (Morata *et al.*, 2015). Cette technique permet l'inactivation de cellules de *B. bruxellensis* dans le vin, de manière temps- et pression-dépendante (150-600 MPa, 5 sec - 3min) (González-Arenzana *et al.*, 2016; van Wyk and Silva, 2017a, 2017b).

Le traitement par champs électriques pulsés est basé sur l'application d'un champ électrique

à haute tension sous forme de courtes impulsions sur le vin (van Wyk *et al.*, 2018). Ce système, principalement utilisé pour améliorer l'extraction des polyphénols à partir du moût, est étudié pour la stabilisation microbiologique des moûts et des vins depuis peu. Les cellules soumises à ce traitement voient la perméabilité de leur membrane augmenter entraînant la formation de pores réversibles puis irréversibles. L'efficacité du traitement pour l'inactivation contre *B. bruxellensis* est plus ou moins élevée selon les études et semble dépendre de plusieurs facteurs, tels que la taille des cellules, la température et la concentration en alcool (Davaux *et al.*, 2019; Delsart *et al.*, 2016; Puértolas *et al.*, 2009; van Wyk *et al.*, 2019, 2018).

D'autres procédés, utilisant le rayonnement UV-C notamment, ont vu le jour. L'exposition du moût ou du vin à ce type de rayonnement permet d'inactiver les micro-organismes contenus dans le liquide. Cette technique a montré une efficacité sur divers micro-organismes du vin comme *Brettanomyces*, *Saccharomyces*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Oenococcus* (Fredericks *et al.*, 2011; Pilard *et al.*, 2021). Cependant, la pénétration du rayonnement UV-C peut être limitée dans les liquides colorés ou troubles, réduisant ainsi son efficacité de stérilisation selon les caractéristiques de la matrice (Diesler *et al.*, 2019; Fredericks *et al.*, 2011; Guerrero-Beltrán and Barbosa-Cánovas, 2004).

Le traitement avec des ultrasons à haute puissance consiste en l'utilisation d'une fréquence de 20 à 100 kHz qui permet d'augmenter localement mais extrêmement la pression et la température dans un liquide (Chemat *et al.*, 2011). Couplée avec de l'eau chaude (thermosonication), cette technique a permis d'éliminer des cellules de *B. bruxellensis* sur les surfaces extérieures et intérieures d'un fût en chêne contaminé (Schmid *et al.*, 2011). En revanche, cette technologie a montré un effet limité sur les levures dans le vin (Gracin *et al.*, 2016; Križanović *et al.*, 2020).

Un traitement par micro-ondes, basée sur l'utilisation d'un générateur de trains d'impulsions de haute fréquence, peut également être appliqué pour réduire les populations microbiennes en profondeur (8 mm) de la surface intérieure de fûts en chêne. Un court traitement (3 minutes) permet une importante diminution de la population de *B. bruxellensis* (González-Arenzana *et al.*, 2013).

6. Capacité d'adaptation et de survie à l'environnement

Bien que le vin soit un milieu hostile (pauvre en nutriments, compétition avec d'autres micro-organismes, traitement désinfectant ...), *B. bruxellensis* est capable de s'adapter, de

survivre dans cet environnement mais également d'être métaboliquement active et de croître. Comme évoqué précédemment, *B. bruxellensis* peut résister au SO₂, même à forte dose puisque des concentrations allant jusqu'à 1,25 mg/L de SO₂ moléculaire sont requises pour contrôler son développement et/ou stopper la production de phénols volatils (Curtin *et al.*, 2015). Chez *S. cerevisiae*, le principal mécanisme de résistance au SO₂ est l'efflux actif à travers une pompe de la membrane plasmique, codée par le gène *SSU1* (Divol *et al.*, 2012; García-Ríos and Guillamón, 2019). Chez *B. bruxellensis*, ce même gène a été retrouvé comme impliqué dans la réponse adaptative spécifique de détoxification dans des cellules réagissant au facteur de stress SO₂ (Bartel *et al.*, 2021; Varela *et al.*, 2020). De plus, afin de favoriser la tolérance au SO₂, les cellules peuvent aussi exploiter des mécanismes non-spécifiques incluant la surexpression de gènes liés aux métabolismes des polyols (membres de la famille déshydrogénases/réductases à chaîne moyenne MDR), des acides aminés (*DIP5*, *LEU5*), des acides gras (*ACHI*, *FOX2*) et au stress oxydatif (*PST3*, *CLD1*) (Valdetara *et al.*, 2020). Cependant, différents comportements vis-à-vis du SO₂ (sensible, tolérant ou résistant) peuvent être observés selon les souches considérées (Avramova *et al.*, 2018b). Des différences entre souches vis-à-vis d'un autre agent antimicrobien, le chitosane, ont également été mis en évidence (Paulin *et al.*, 2020).

De nombreux travaux se sont intéressés à la capacité de *B. bruxellensis* à entrer en état VNC, une stratégie décrite pour jouer un rôle crucial dans la survie des micro-organismes d'altération tout au long du processus de fermentation du vin jusque dans la bouteille (Agnolucci *et al.*, 2010; Capozzi *et al.*, 2016; du Toit *et al.*, 2005; Longin *et al.*, 2016a; Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Nunes de Lima *et al.*, 2021; Serpaggi *et al.*, 2012; Zuehlke and Edwards, 2013). Dans cet état, les cellules ne sont pas capables de se multiplier et se développer sur milieu de culture bien qu'elles soient métaboliquement actives. Lorsque les conditions environnementales s'améliorent, une cellule en état VNC est capable de redevenir cultivable (ressuscitation). En vinification, cet état représente une véritable problématique, notamment lors de la détection de *B. bruxellensis* qui comprend l'utilisation de techniques culture-dépendantes (Rodrigues *et al.*, 2001). De plus, il a été décrit que l'application de certaines techniques de contrôle des contaminations microbiennes lors de la vinification pouvaient induire l'état VNC chez *B. bruxellensis*, telles que la thermosonication (Križanović *et al.*, 2020) et l'utilisation de SO₂ (Longin *et al.*, 2016a; Serpaggi *et al.*, 2012; Zuehlke and Edwards, 2013). Une fois de plus, le comportement VNC est souche-dépendant chez *B. bruxellensis* (Agnolucci *et al.*, 2014; Capozzi *et al.*, 2016; Zuehlke and Edwards, 2013).

Outre sa résistance aux traitements antimicrobiens, *B. bruxellensis* possède de nombreux

atouts pour s'adapter aux caractéristiques du vin et se développer dans le produit, qui sont largement dépendants de la souche.

Bien que la température optimale de croissance de *B. bruxellensis* soit environ 28°C, certaines souches peuvent résister à de forts écarts de température et se développer de 10°C à 37°C (Blomqvist *et al.*, 2010; Conterno *et al.*, 2006; Zuehlke and Edwards, 2013).

L'éthanol, un des composants majoritaires dans le vin, est majoritairement produit par les levures au cours de la FA. La concentration en éthanol, qui peut atteindre 12 – 16 % en fin de fermentation, inhibe généralement la croissance de levures non-*Saccharomyces* (Benito *et al.*, 2019; Pina *et al.*, 2004; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b). Cependant, *B. bruxellensis* montre une tolérance élevée à l'éthanol. Elle peut se développer dans des vins avec 13,8% d'éthanol, ou dans des milieux contenant jusqu'à 15% d'éthanol (Barata *et al.*, 2008; Cibrario *et al.*, 2020; Coulon *et al.*, 2010; Rozpędowska *et al.*, 2011; Sturm *et al.*, 2014). Chez *B. bruxellensis*, la résistance à l'éthanol est également souche-dépendante (Vigentini *et al.*, 2008) comme chez *S. cerevisiae* (Lewis *et al.*, 2010).

Le vin est également caractérisé par une forte acidité avec un pH entre 3,0 et 4,0 (Divol *et al.*, 2012; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b). Il se trouve que *B. bruxellensis* est résistante face à de faibles pH. Elle peut être retrouvée dans des vins à pH 3,4 (Barata *et al.*, 2008). Comme pour l'éthanol, cette caractéristique est dépendante de la souche, certaines pouvant se développer en milieu synthétique jusqu'à pH 2,0 (Blomqvist *et al.*, 2010; Cibrario *et al.*, 2020; Conterno *et al.*, 2006; Rozpędowska *et al.*, 2011).

B. bruxellensis présente la capacité de former des filaments ou pseudohyphes (**Figure 12**) (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000; Echeverrigaray *et al.*, 2013; Louw *et al.*, 2016; Martyniak *et al.*, 2017; Vigentini *et al.*, 2013), caractéristiques communes à d'autres levures telles que *S. cerevisiae* ou *Candida albicans* (Bauer and Pretorius, 2001; Carstens *et al.*, 1998; Sudbery, 2011). D'après la littérature, la formation de filaments peut être induite par des carences ou une faible disponibilité en nutriments. Cette capacité peut ainsi être interprétée comme une réponse à la recherche de nourriture car les levures ne sont pas mobiles et qu'elle ne peuvent que croître pour explorer leur environnement (Dickinson, 2008). La filamentation chez *B. bruxellensis* semble dépendre de plusieurs facteurs tels que la souche et la composition du milieu, même si les facteurs d'induction ne sont pas encore connus (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000; Louw *et al.*, 2016).

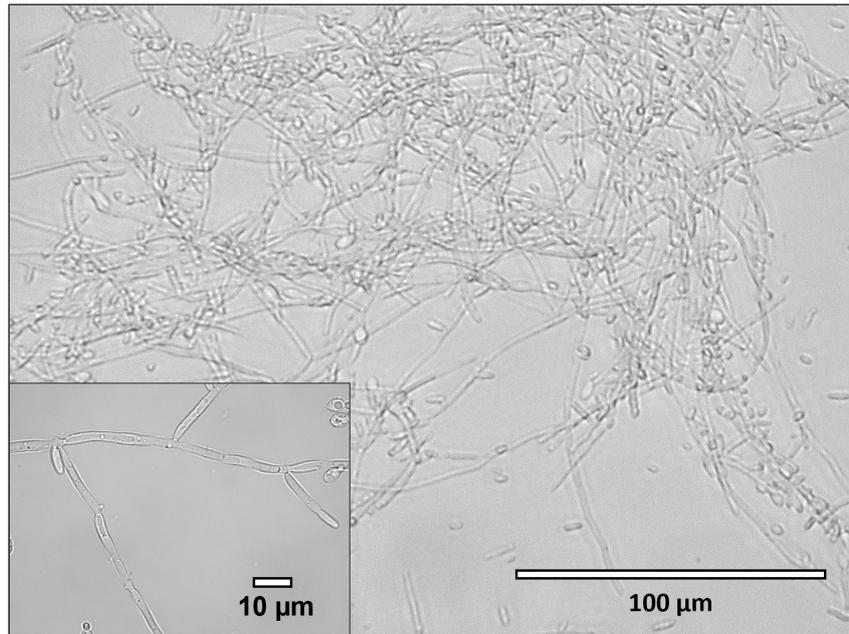


Figure 12. Observation microscopique de filaments produits par *Brettanomyces bruxellensis*. Source personnelle.

Bien que *B. bruxellensis* soit une espèce redoutée par la filière viti-vinicole ou une espèce d'intérêt pour la production de certaines bières, elle reste encore peu connue au niveau génétique et génomique. Pour l'espèce *B. bruxellensis*, 9 génomes ont été complètement séquencés dont un entièrement assemblé (Di Canito *et al.*, 2021; Haase *et al.*, 2021), disponibles sur NCBI (National Center for Biotechnology Information). L'analyse des génomes a révélé la présence de plusieurs gènes liés à la tolérance aux stress (Crauwels *et al.*, 2014; Curtin *et al.*, 2012; Godoy *et al.*, 2017; Woolfit *et al.*, 2007). Au sein de l'espèce *B. bruxellensis*, les souches sont diploïdes ou triploïdes (Avramova *et al.*, 2018a). Il est considéré qu'il existe un « core » génome diploïde, commun à la majorité des souches. Les souches triploïdes possèdent un génome supplémentaire différent du « core », acquis par hybridation avec une autre souche de l'espèce *B. bruxellensis* ou d'une autre espèce (Borneman *et al.*, 2014; Eberlein *et al.*, 2021). Etant donné que chez *B. bruxellensis*, l'état triploïde est majoritaire chez les groupes génétiques tolérants au SO₂, ce jeu supplémentaire de chromosomes conférerait un avantage sélectif aux conditions de vinification (Avramova *et al.*, 2019). De plus, cette espèce présente un caryotype variable selon les souches (Hellborg and Piškur, 2009). Ainsi, ces différents niveaux de ploïdie et les réarrangements chromosomiques sont à l'origine de l'importante variabilité génétique au sein de l'espèce *B. bruxellensis*.

Enfin, une autre stratégie de résistance mise en place par *B. bruxellensis* pour faire face aux conditions stressantes et persister dans l'environnement viti-vinicole a été proposée : la formation de biofilm.

Partie 2. Les biofilms

L'étude des biofilms s'est intensifiée depuis plusieurs années, et a amené à considérer les modes de vie autres que planctonique, de la simple population de micro-organismes sur un support, à des communautés de micro-organismes complexes aux fonctions et architectures spécifiques qui s'appliquent à toutes les espèces microbiennes. Le biofilm est un mode de vie à part entière et est aujourd'hui considéré comme la principale forme de vie des micro-organismes. Ainsi, cette thématique amène les chercheurs de divers horizons à faire progresser les connaissances dans ce domaine (Coenye *et al.*, 2020).

1. Une large définition

Le premier biofilm a été observé il y a plusieurs siècles, sans aucune idée de sa nature et encore moins de la définition d'un biofilm. C'est en 1683 que Antonie Van Leeuwenhoek a examiné une plaque dentaire à l'aide de son microscope nouvellement développé et a décrit « dans la matière blanchâtre aussi épais qu'une pâte « ... » grouillaient de petits animaux vivants qui se déplaçaient de manière extravagante » (Boutibonnes, 2003). Cependant, ce n'est qu'au début du XX^{ème} siècle que l'attention scientifique s'est tournée vers le « film », un terme qui a permis d'introduire l'observation de micro-organismes qui se fixaient et se multipliaient sur des lames immergées dans un liquide (Henrici, 1933; Zobell and Allen, 1933). Par la suite, le mode de vie microbien sessile a été progressivement reconnu comme omniprésent et prédominant dans de nombreux environnements, aussi bien dans les écosystèmes aquatiques que dans les interactions de micro-organismes avec des plantes, animaux et humains (Flemming and Wuertz, 2019; Kolter and Greenberg, 2006). La première transition de l'utilisation du terme « film » à celui de « biofilm » a été faite par Mack *et al.* en 1975 lors d'une description d'un « filtre à ruissellement à film microbien » (Flemming *et al.*, 2021; Mack *et al.*, 1975).

L'étude de ce mode de vie va s'étoffer pour devenir un domaine de recherche à part entière et s'étendre à de nombreux domaines qui se retrouvèrent à travers une définition élargie de ces communautés microbiennes. Par exemple, la description d'une résistance accrue et d'une élimination plus difficile des cellules contenues dans les films par rapport aux cellules planctoniques (Costerton and Cheng, 1975; LeChevallier *et al.*, 1988) combinée à la capacité d'adhésion, a permis d'étendre le concept de biofilm des systèmes industriels au domaine médical. Ainsi, beaucoup de descriptions se sont retrouvées sous le terme biofilm. La définition s'est développée, pour devenir plus qu'un simple film ou colonie de micro-organismes

supportés par un support dans un environnement aqueux. Si les micro-organismes du biofilm étaient de simples cellules planctoniques ayant adhérentes à une surface, l'étude du biofilm aurait peu d'impact, mais ces deux modes de vie sont manifestement et profondément différents (Costerton *et al.*, 1995). Plusieurs modèles ont été décrits selon les disciplines, avec des points communs : (i) une communauté de micro-organismes adhérents (ii) vivants en synergie, (iii) développée à une interface, et (iv) avec présence d'une matrice. La définition du biofilm ne s'est donc pas restreinte aux films microbiens, mais a été appliquée à des agrégats multicellulaires.

Aujourd'hui, la définition du biofilm n'est pas claire, tous les chercheurs n'appliquent pas le terme biofilm de manière synonyme et cela peut amener à des discussions animées. En raison de ces diverses définitions, des différences existent dans l'application de la terminologie à diverses communautés microbiennes, et il n'est pas clair de ce qui est qualifiable de biofilm. Sous le terme biofilm peuvent se retrouver, par exemple chez les levures, les flocs ou agrégats de cellules adhérentes entre elles, les films développés sur une surface solide (film) ou semi solide (mats), à une interface air-liquide (flor ou voile), mais également les colonies avec une architecture complexe (dites « fluffy ») composées de cellules adhérentes (**Figure 13**) (Brückner and Mösch, 2012; Flemming *et al.*, 2021; Harding *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2018; Reynolds and Fink, 2001). De ce fait, certaines communautés microbiennes sont incluses ou exclues de la définition selon les critères considérés comme l'adhésion volontaire (différent de la sédimentation), l'adhésion à un support solide déjà présent, ou encore la croissance dans un environnement liquide.

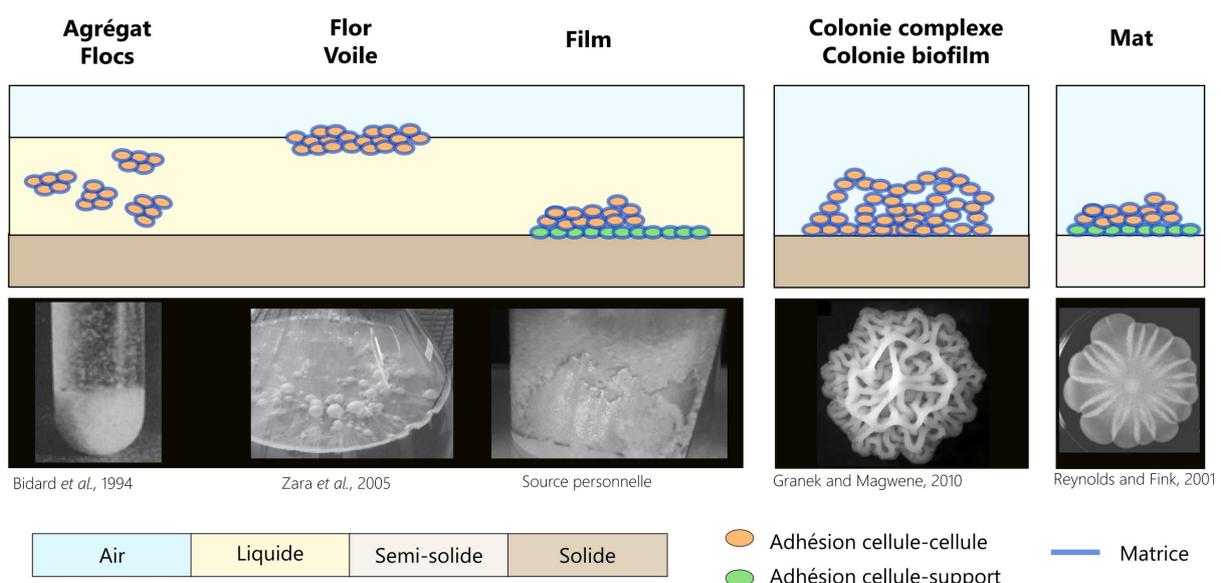


Figure 13. Exemples de communautés microbiennes définies comme biofilm dans la littérature, notamment chez les levures. D'après Brückner and Mösch, 2012.

Afin d'éviter les confusions entre les différentes communautés microbiennes décrites dans la littérature et délimiter ce qui est considéré comme biofilm dans ce travail, une définition précise a été retenue, comportant plusieurs critères à remplir. Il s'agit d'une communauté de cellules adhérentes à un support et entre elles, développées à une interface solide-liquide et englobées dans une matrice autoproduite de substances extracellulaires polymériques (EPS). Les autres définitions seront regroupées sous le terme « biofilm-like ».

2. Les étapes de formation d'un biofilm

Même si l'étude des biofilms a intensivement concerné les bactéries, ce mode de vie n'est pas exclusif aux procaryotes (Flemming and Wuertz, 2019). Il a été proposé chez les champignons filamenteux (Harding *et al.*, 2009), et décrit et étudié de plus en plus chez les levures, en particulier chez *Candida* spp., levures commensales des surfaces muqueuses chez l'homme mais qui constituent l'une des principales causes d'infections nosocomiales (**Figure 14**) (Soll and Daniels, 2016).

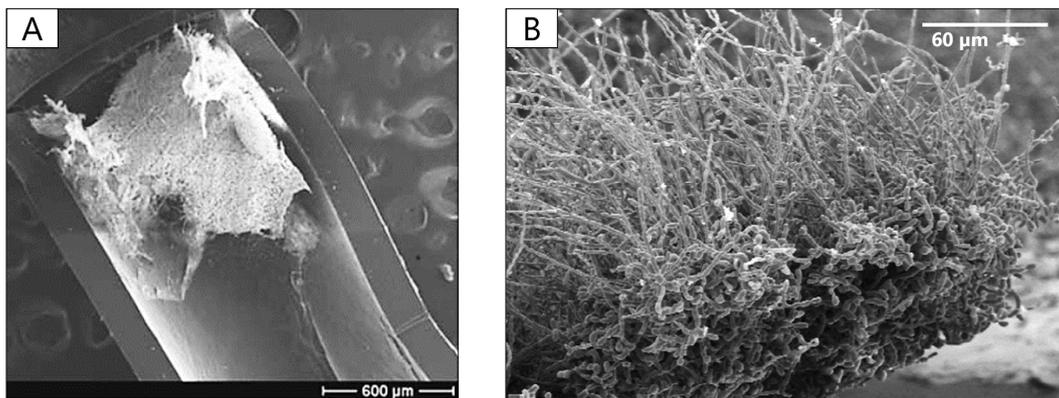


Figure 14. Observation au microscope électronique à balayage de biofilm formé par (A) *Candida albicans* sur un cathéter *in vivo* (Nobile *et al.*, 2009) ; (B) *Candida tropicalis* sur polystyrène *in vitro* (Jones *et al.*, 2014).

Ainsi, le modèle de formation de biofilm chez les levures est similaire au modèle bactérien tout en intégrant la croissance filamenteuse. La mise en place du mode de vie se déroule en plusieurs étapes (**Figure 15**) (Blankenship and Mitchell, 2006; Chandra and Mukherjee, 2015; Soll and Daniels, 2016). Ce processus commence par l'adhésion des cellules entre elles et à un support biotique ou abiotique, considérée comme l'étape d'ancrage cruciale (Blankenship and Mitchell, 2006; Bojsen *et al.*, 2012; Gulati and Nobile, 2016). Une fois adhérentes, les cellules prolifèrent pour former une couche basale. Au cours de la formation de biofilm, des pseudohyphes et des hyphes peuvent se former à partir des cellules adhérentes en division, et continuer de s'allonger et proliférer pour former des couches supérieures plus complexes.

Pendant cette maturation du biofilm, une matrice est auto-produite par les cellules. Le biofilm ainsi formé présente une structure en trois dimensions, représentant un véritable réseau complexe de plusieurs couches où différents morphotypes de cellules (hyphes, pseudohyphes, cellules levures) sont englobés dans la matrice. Une fois mature, des cellules peuvent se détacher du biofilm et se disperser pour s'implanter dans de nouveaux sites et ainsi permettre l'initiation d'un nouveau cycle de formation de biofilm. Chez *C. albicans*, il a été montré que la libération des cellules dépendait fortement de l'environnement, comme des nutriments disponibles ou du pH (Uppuluri *et al.*, 2010a).

Les filaments ont un rôle structurant important dans le biofilm de *C. albicans* puisque ce sont des éléments essentiels pour garantir l'intégrité structurale du biofilm (Baillie and Douglas, 1999). De plus, il a été montré que la teneur en cellules filamenteuses est directement corrélée à la solidité et à la résistance du biofilm, probablement en raison de la plus grande quantité de chitine dans les cellules filamenteuses (Paramonova *et al.*, 2009).

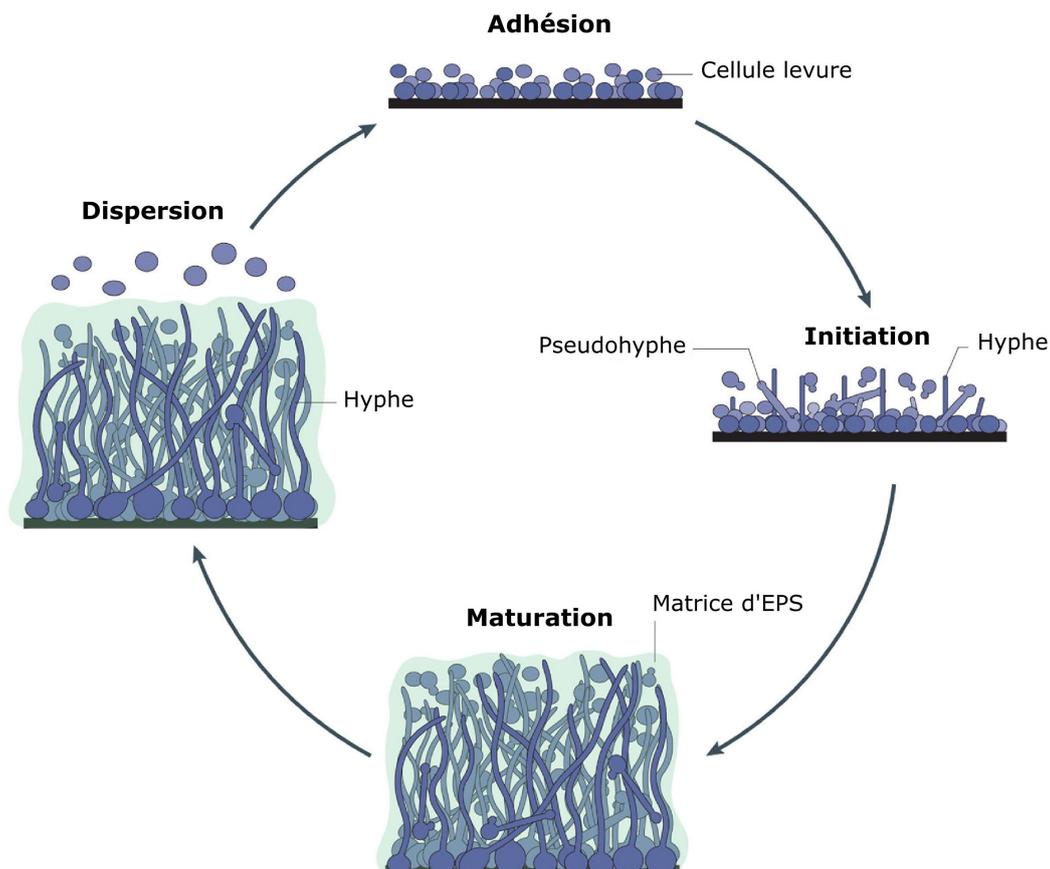


Figure 15. Formation de biofilm chez *Candida albicans*. Adapté de Lohse *et al.*, 2018.

3. Quorum sensing

Chez les bactéries, l'organisation des biofilms est fortement dépendante du mécanisme de « quorum sensing » (QS), intensément étudié puisque ces deux aspects (biofilm et QS) sont considérés comme centraux dans la pathogénèse bactérienne (Nadell *et al.*, 2008). Le QS est un processus de communication cellulaire par échange de signaux chimiques entre cellules, impliquant des mécanismes moléculaires de régulation d'expression de gènes dépendant de la densité cellulaire (Miller and Bassler, 2001).

Le QS chez les levures, étudié depuis une vingtaine d'années, est également impliqué dans les changements morphologiques et la formation de biofilm chez plusieurs espèces (Blankenship and Mitchell, 2006; Deveau and Hogan, 2011; Wongsuk *et al.*, 2016). Même si ce mécanisme complexe est encore peu compris, plusieurs molécules de QS (QSM) ont été décrites comme jouant un rôle dans la formation de biofilm (Albuquerque and Casadevall, 2012). Chez *Debaryomyces hansenii*, le phényléthanol et le tyrosol augmentent la capacité de cette levure à adhérer à une surface polystyrène alors que le tryptophol et le farnésol réduisent cette capacité (Gori *et al.*, 2011). Le tyrosol et le farnésol sont les QSM les plus étudiées pour leur rôle dans la croissance, les changements morphologiques et la formation de biofilm chez *Candida* spp. (Jabra-Rizk *et al.*, 2006; Ramage *et al.*, 2002; Sebaa *et al.*, 2019). Par exemple, le tyrosol stimule la production d'hyphes dans les étapes précoces du développement de biofilm alors que le farnésol inhibe la formation de biofilm, la filamentation et favorise la libération des cellules du biofilm et ainsi leur dispersion (Alem *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2004; Hornby *et al.*, 2001).

4. Matrice du biofilm

L'un des composés essentiels du biofilm est la matrice composée de substances extracellulaires polymériques autoproduites lors du développement du biofilm, qui va englober la communauté microbienne. Cette matrice d'EPS entoure les cellules et les immobilisent, favorisant ainsi la mise en place d'interactions spatiales stables. Les EPS déterminent en grandes parties les propriétés mécaniques des biofilms. Ils assurent un équilibre entre la stabilité structurelle du réseau et un degré de flexibilité qui permet le développement de la communauté microbienne (Flemming *et al.*, 2016). Un véritable micro-environnement est ainsi formé dans lequel les cellules évoluent dans divers gradients de pH, d'oxygène dissout, de potentiel redox et de nutriments, et leur procurent de nombreux avantages par rapport au mode de vie planctonique, bien décrits chez les bactéries (**Tableau 5**).

Tableau 5. Fonctions des substances extracellulaires polymériques (EPS) dans les biofilms bactériens. Adapté de Flemming and Wingender, 2010 et Flemming *et al.*, 2021.

Fonction	Avantage pour le biofilm
Adhésion	Etape initiale de la colonisation de surfaces biotique et abiotique, attachement à long terme du biofilm aux surfaces
Cohésion du biofilm	Détermination de la structure, la stabilité. Favorise la communication cellulaire et un développement à long terme d'un consortium synergique entre différentes espèces
Rétention d'eau	Maintien d'un microenvironnement fortement hydraté autour des micro-organismes dans le biofilm. Résistance à la dessiccation
Barrière protectrice	Tolérance à de nombreux agents antimicrobiens (désinfectants, antibiotiques)
Capture et rétention de composés	Accumulation de nutriments à partir de l'environnement
Rétention d'enzymes extracellulaires	Système de digestion extracellulaire permettant apport de nutriments et dégradation de la matrice pour permettre le détachement de cellules du biofilm
Echange d'information génétique	Facilité le recyclage des acides nucléiques et le transfert de gènes horizontal entre les cellules du biofilm

Si la composition et le rôle de la matrice dans les biofilms bactériens ont largement été étudiés (Flemming, 2016; Flemming and Wingender, 2010; Schlafer and Meyer, 2017), les données concernant les levures sont plus limitées et concernent notamment *C. albicans* (**Figure 16**). Avec des premiers travaux réalisées dans les années 1990 (Hawser *et al.*, 1998; Hawser and Douglas, 1994), les études ont montré que chez les levures également, l'ensemble des composants de la matrice interagissent les uns avec les autres et forment un réseau à l'origine de l'intégrité du biofilm. Ils sont également impliqués tout au long du développement du biofilm, de l'adhésion aux surfaces aux premières étapes de formation et sur le long terme, jusqu'à la dispersion du biofilm (Mitchell *et al.*, 2016a).

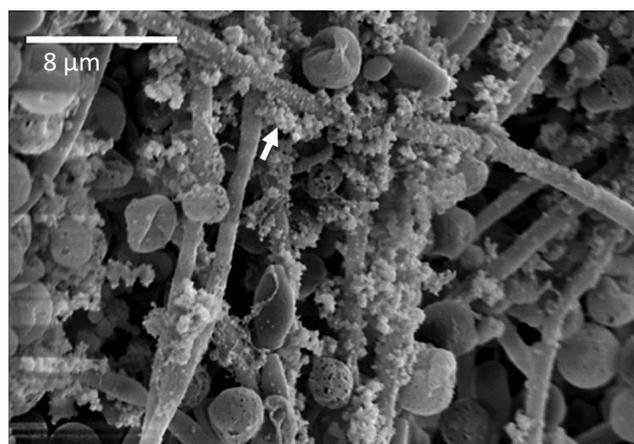


Figure 16. Observation au microscope électronique à balayage d'un biofilm de *Candida albicans* révélant la matrice (indiquée par une flèche), (Nett *et al.*, 2011).

Globalement, la matrice du biofilm est composée majoritairement de glucides, protéines, lipides et ADN extracellulaire (ADNe), qui façonnent le squelette de la matrice, seuls ou par

interactions les uns avec les autres. Ces composés sont présents en proportions variables selon les espèces et les souches (Mitchell *et al.*, 2016b). De plus, des écarts importants de proportion entre les études apparaissent (**Tableau 6**), pouvant être liés aux méthodes d'extraction des EPS. De même, la composition de la matrice peut varier selon l'environnement comme le milieu de culture, la température, le pH (Pierce *et al.*, 2017). Par exemple, la proportion d'une fraction peut varier d'un facteur trois voire dix selon les études ou les conditions environnementales. Chez *C. albicans*, le modèle levurien le plus étudié, les fractions majoritaires sont les glucides et les protéines, suivies par les lipides et les acides nucléiques (Chandra and Mukherjee, 2015; Pierce *et al.*, 2017; Zarnowski *et al.*, 2014).

Tableau 6. Exemples de composition en EPS de la matrice de biofilms de levures. Adapté de Mitchell *et al.*, 2016b. Références : 1 = Al-Fattani and Douglas, 2006 ; 2 = Zarnowski *et al.*, 2014 ; 3 = Martins *et al.*, 2010 ; 4 = Silva *et al.*, 2009 ; 5 = Fernandes *et al.*, 2015.

Espèces en biofilm	Glucides	Protéines	Lipides	Acides nucléiques	Autre
<i>Candida albicans</i>	25% - 39,6% dont glucose, α -1,6 mannane ramifiés en α -1,2, β -1,6 glucane et β -1,3 glucane	5% - 55% protéines avec 458 fonctions distinctes	15% dont glycérolipides neutres (89,1%) et polaires (10,4%), sphingolipides (0,5%), ergostérol	5% d'ADN extracellulaire, principalement des séquences non- codantes	0,5% phosphore 0,1% acide uronique 3,3% hexosamine
Références	1, 2	1, 2	2	2, 3	1
<i>Candida glabrata</i>	23,4% - 74,3%	13,6% - 32,5%	-	-	-
Références	4	4			
<i>Candida parapsilosis</i>	26,4% - 92,7%	2,0% - 8,1%	-	-	-
Références	4	4			
<i>Candida tropicalis</i>	1,1% - 36,3%	2,8% - 17,5%	-	-	0,2% phosphore 1,6% acide uronique 27,4% hexosamine
Références	1, 4, 5	4, 5			1

La fraction glucidique est constituée notamment de glucose, souvent décrit comme le composé principal, mais également d'autres composés, comme les α -1,6 mannane, β -1,3 glucane et β -1,6 glucane, impliqués dans la résistance de *Candida* aux médicaments (Zarnowski *et al.*, 2014). En effet, il a été montré que les glucanes extracellulaires entravent la diffusion des médicaments en séquestrant les antifongiques comme le fluconazole (Nett *et al.*, 2010).

Les protéines contenues dans la matrice sont principalement des enzymes impliquées dans différentes fonctions métaboliques, qui pourraient participer à la dégradation de molécules piégées dans la matrice pour fournir de l'énergie aux cellules présentes dans le biofilm

(Zarnowski *et al.*, 2014). Ce rôle a été décrit chez les bactéries, en plus de l'implication des protéines dans l'adhésion des cellules aux surfaces, la résistance aux stress, la stabilisation de la matrice du biofilm et la dissolution du biofilm pour sa dispersion (Fong and Yildiz, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

La part lipidique de la matrice contient des glycérolipides, majoritaires, mais également des sphingolipides et de l'ergostérol (Zarnowski *et al.*, 2014). Le rôle structurel des lipides de la matrice dans la formation de biofilm reste encore inconnu (Alim *et al.*, 2018). Néanmoins, il a été montré que les rafts lipidiques, essentiels au maintien de l'intégrité membranaire, sont plus nombreux chez les cellules de *C. albicans* développées en biofilm et jouent un rôle dans le développement de biofilm (Alim *et al.*, 2018; Lattif *et al.*, 2011).

Comme décrit pour les bactéries (Flemming and Wingender, 2010), une fraction d'ADNe est présente dans les biofilms de *C. albicans*, composée majoritairement de séquences non-codantes (Martins *et al.*, 2010; Zarnowski *et al.*, 2014). L'ADNe contenu dans la matrice du biofilm de *C. albicans* contribue à son maintien et sa stabilité, et serait également impliqué dans la résistance du biofilm aux antifongiques (Martins *et al.*, 2010).

Concernant l'espèce *S. cerevisiae*, les données disponibles concernant la matrice proviennent de l'étude de communautés « biofilm-like », comme les colonies complexes non-lisses qui possèdent des caractéristiques communes aux biofilms (production importante de matrice, grande capacité de rétention d'eau, production d'adhésines pour adhésion et formation d'une architecture 3D) contrairement aux colonies classiques (Kuthan *et al.*, 2003; Váchová *et al.*, 2011). De la même manière, les cellules de *S. cerevisiae* présentes dans les floccs sont englobées d'une matrice constituée de polysaccharides, principalement composés de glucose, mannose et galactose, dont une partie serait liée à des protéines sous forme de glycoprotéines (Beauvais *et al.*, 2009).

Jusqu'à présent, les méthodes utilisées pour l'analyse des EPS de la matrice d'un biofilm comportent des protocoles d'extraction et de quantification de composés qui ciblent généralement des molécules spécifiques d'intérêt et non la matrice entière (Flemming and Wingender, 2010). En développant les connaissances sur le mode de vie biofilm, de nouveaux composants de la matrice pourront être caractérisés et devenir de potentielles nouvelles cibles pour l'élimination des biofilms. Si des méthodes d'inhibition ou de désorganisation de la matrice sont développées, elles pourraient s'avérer très utiles en combinaison des traitements de nettoyage existants, qui pourraient alors atteindre les cellules plus facilement.

5. Biofilms dans le domaine agroalimentaire

5.1. Biofilms levuriens : impacts positif et négatif

Les biofilms peuvent représenter un véritable challenge sanitaire et économique dans le domaine agroalimentaire lorsque des espèces pathogènes ou d'altération colonisent les surfaces et deviennent une source de contamination récurrente d'aliments (Abdallah *et al.*, 2014; Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2019; Bridier *et al.*, 2015), mais ils peuvent également avoir un intérêt industriel en contribuant à l'élaboration de produits fermentés (Bastard *et al.*, 2016; Maksimova, 2014). Les levures font partie des micro-organismes pouvant être retrouvés au sein de ces biofilms (Zara *et al.*, 2020).

Impliquées dans le procédé de fermentation des olives, les levures jouent un rôle important dans le développement des caractéristiques sensorielles. Les levures *Geotrichum candidum*, *Pichia galeiformis*, *Candida sorbosa* et *Pichia membranifaciens* peuvent former des biofilms mixtes avec des bactéries lactiques comme *Lactiplantibacillus pentosus* (anciennement *Lactobacillus pentosus*) à la surface des olives (**Figure 17A**) et sur des supports en verre. Par rapport aux micro-organismes qui ne forment pas de biofilm, la capacité de colonisation de la surface des olives représente un avantage adaptatif permettant aux micro-organismes contenus dans le biofilm d'accéder à davantage de nutriments et de résister aux stress induits par la fermentation (Arroyo-López *et al.*, 2012; Benítez-Cabello *et al.*, 2015; Domínguez-Manzano *et al.*, 2012). Les biofilms ont également un rôle important dans la filière des produits laitiers, en influençant la qualité des produits positivement ou négativement. Par exemples, des zones d'évacuation des eaux au sol (drains de plancher) peuvent être colonisées majoritairement par des communautés microbiennes comprenant de bactéries associées à l'élaboration du produit et des levures telles que *D. hansenii* et *Saccharomyces unisporus* (Schön *et al.*, 2016; Stellato *et al.*, 2015). Ainsi, la colonisation de l'environnement par des micro-organismes d'intérêt ou non pathogènes ainsi que leur persistance présentent plusieurs avantages : empêcher le développement de micro-organismes d'altération ou pathogènes et fournir une source de micro-organismes indigènes d'intérêt pouvant participer à l'élaboration du produit.

Outre les aliments, les levures sont également présentes dans l'industrie des boissons fermentées. La kombucha est une boisson fermentée à base de thé qui comprend un biofilm à l'interface air-liquide, appelé pellicule ou mère de kombucha (**Figure 17B**). Ce biofilm air-liquide est une culture symbiotique (SCOBY) de bactéries (bactéries acétiques et lactiques) et de levures (des genres *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia* par

exemple). Il est aussi à noter que *B. bruxellensis* est l'espèce levurienne majoritairement retrouvée dans les consortia de kombucha (Coton *et al.*, 2017; Harrison and Curtin, 2021; Tran *et al.*, 2020). Dans l'industrie brassicole, les caractéristiques des bières sont directement liées à l'activité fermentaire des levures, notamment *S. cerevisiae* (Iorizzo *et al.*, 2021). Dans les basseries, il a été montré que les levures peuvent former des biofilms qui colonisent les surfaces, comme *P. anomala*, *S. cerevisiae*, *Dekkera anomala*, *P. membranifaciens* ou encore *D. hansenii* (Laitila *et al.*, 2011; Storgårds *et al.*, 2006; Timke *et al.*, 2008).

L'industrie vinicole ne fait pas exception à l'implication des levures et de leur mode de vie biofilm. Un exemple avec un impact positif est celui du voile (**Figure 17C**), un biofilm air-liquide principalement composé des levures de voile *S. cerevisiae*, formé à la surface de certains vins lors du vieillissement (vins de Xéres, vin jaune, Vernaccia di Oristano, Szamorodni) (David-Vaizant and Alexandre, 2018; Legras *et al.*, 2016). En plus de sa capacité à former des biofilms à l'interface air-liquide (Zara *et al.*, 2011, 2010), *S. cerevisiae* est également capable de former des mats et d'adhérer à des surfaces plastiques. Ces phénotypes sont impactés par diverses paramètres comme la concentration en sucres du milieu ou la présence de polyphénols (Reynolds and Fink, 2001; Sidari *et al.*, 2014; Tek *et al.*, 2018). De plus, il a été montré que les levures non-*Saccharomyces* isolées du vin, comme *Pichia manshurica*, *Pichia kudriavzevii*, *P. membranifaciens*, *Candida sojae*, *Candida parapsilosis*, *Candida sonorensis*, *Lodderomyces elongisporus*, *Sporopachydermia lactativora* et *Clavispora lusitaniae* pouvaient elles aussi adhérer à des surfaces plastiques, d'acier inoxydable ou former des mats et des biofilms à l'interface air-liquide (Perpetuini *et al.*, 2021, 2018).

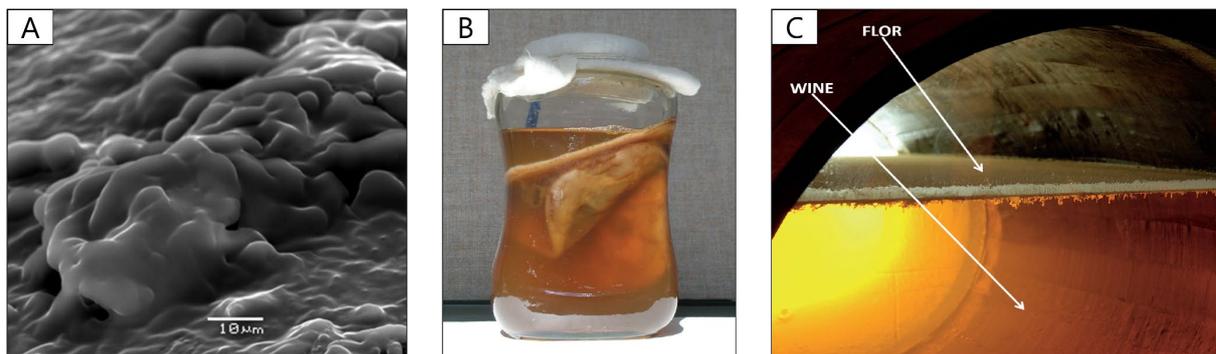


Figure 17. (A) Observation au microscope électronique à balayage de micro-organismes englobés dans une matrice formant un biofilm à la surface d'olives en fermentation (Benítez-Cabello *et al.*, 2015). (B) Mère de kombucha (Römling and Galperin, 2015). (C) Voile à la surface d'un vin de Xéres en vieillissement (Cañete *et al.*, 2018).

5.2. *Brettanomyces bruxellensis* et biofilms ?

La levure *Brettanomyces bruxellensis* a également fait l'objet d'études concernant ses capacités d'adhésion et de formation de biofilm, étant donnée son implication dans certains produits fermentés.

B. bruxellensis a été isolée sur diverses surfaces, que ce soit sur des équipements d'une brasserie (Suiker *et al.*, 2021) ou sur le matériel vinaire et les fûts (voir Partie 1, paragraphe 2.4). *B. bruxellensis* a été identifiée avec d'autres micro-organismes au sein de biofilms à l'origine de l'élaboration de produits fermentés, comme les voiles formés à la surface de vins lors de l'élevage (David-Vaizant and Alexandre, 2018) et la mère de kombucha dans laquelle *B. bruxellensis* est l'une des espèces levuriennes dominantes (Harrison and Curtin, 2021). Ainsi, il semblerait que la levure *B. bruxellensis* soit tout à fait capable d'adhérer à des surfaces et persister sous cette forme adhérente.

Jusqu'à maintenant, peu d'études se sont penchées sur la capacité de *B. bruxellensis* à former des biofilms (Dimopoulou *et al.*, 2019; Echeverrigaray *et al.*, 2013; Ishchuk *et al.*, 2016; Joseph *et al.*, 2007; Kregiel *et al.*, 2018; Poupault, 2015; Tristezza *et al.*, 2010; Tubia *et al.*, 2018a). Il a été montré que plusieurs souches de *B. bruxellensis* peuvent adhérer sur différents supports tels que le polystyrène (Dimopoulou *et al.*, 2019; Echeverrigaray *et al.*, 2013; Joseph *et al.*, 2007; Poupault, 2015; Tristezza *et al.*, 2010), l'acier (Poupault, 2015) ou le verre (Kregiel *et al.*, 2018). Joseph *et al.*, 2007 ont également montré que parmi les 38 isolats capables d'adhérer à une surface en milieu minimal supplémenté en glucose en 6 heures, seule la moitié ont pu se développer en biofilm dans un milieu moût/eau/éthanol en 10 jours. De même, des différences entre souches à se développer sur une surface en milieu YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) ou milieu vin synthétique ont été observées récemment (Dimopoulou *et al.*, 2019). Ce caractère souche-dépendant a également été décrit quant à la capacité de souches à coloniser une surface de manière homogène et former des structures denses (Poupault, 2015). De plus, l'efficacité d'adhésion et le développement de biofilm semblent être dépendants de l'environnement, comme le pH (Joseph *et al.*, 2007) et les nutriments disponibles dans le milieu (Kregiel *et al.*, 2018). Ce point est important pour la comparaison de résultats puisque chaque étude utilise des milieux différents pour évaluer la capacité de *B. bruxellensis* à adhérer et former des biofilms, dont une seule a été menée en milieu vin rouge (Tristezza *et al.*, 2010).

Cependant, il faut noter que dans toutes ces études, le terme biofilm est utilisé alors que les méthodes d'étude se limitent à de la quantification de cellules adhérentes, par dénombrement

(Tristezza *et al.*, 2010), mesure d'absorbance après coloration (Dimopoulou *et al.*, 2019; Echeverrigaray *et al.*, 2013; Ishchuk *et al.*, 2016; Joseph *et al.*, 2007) ou ATPmétrie (Kregiel *et al.*, 2018). Une étude propose également d'évaluer la formation de biofilm de *B. bruxellensis* par spectroscopie d'impédance utilisant des capteurs microélectrodes interdigitées (Tubia *et al.*, 2018a). L'utilisation de méthodes indirectes pour étudier les biofilms est largement répandue chez les modèles dont le biofilm a été déjà caractérisé (Azeredo *et al.*, 2017; Coenye *et al.*, 2020). Cependant, dans le cas d'un micro-organisme nouvellement révélé comme capable de former des biofilms, cette approche est à compléter pour valider la description d'un biofilm. En effet, pour répondre à la définition d'un biofilm, il est nécessaire d'étudier la présence d'autres caractéristiques comme sa structure 3D et de confirmer la présence de matrice d'EPS, éléments essentiels d'un biofilm. Dans le cas de *B. bruxellensis*, il y a un manque d'observations microscopiques qui pourraient mettre en évidence ces éléments. Jusqu'à maintenant, seul Poupault (2015) a décrit par microscopie confocale différentes capacités d'adhésion avec des structures tridimensionnelles plus ou moins denses (**Figure 18**).

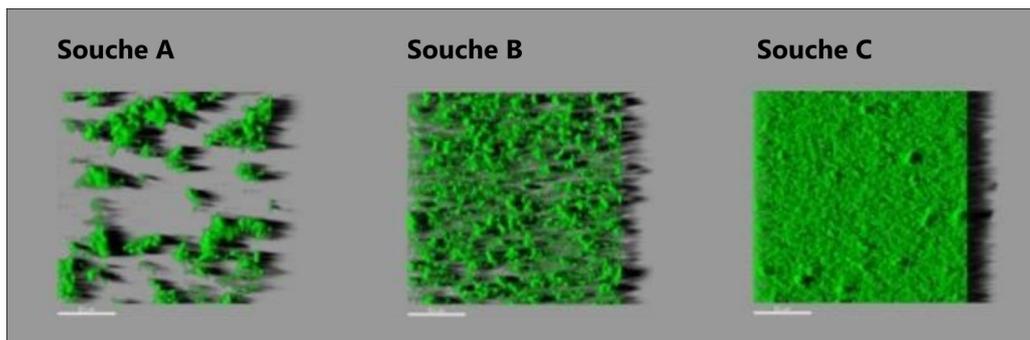


Figure 18. Observations microscopiques des structures tridimensionnelles formées par trois souches de *Brettanomyces bruxellensis* sur microplaque après marquage au Syto9. Adapté de Poupault, 2015, AgroParisTech UMR Micalis.

6. Déterminants génétiques et environnementaux de la formation de biofilm

6.1. Aspect génétique

La production de matrice ainsi que certains phénotypes des cellules en biofilm sont liés à des changements dans l'expression génétique par rapport à des cellules planctoniques. La mise en place de la structure complexe qu'est un biofilm est contrôlée à différentes étapes par divers gènes qui influencent les propriétés d'adhésion, les changements morphologiques ou la production de matrice. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de biofilm chez les levures ont été majoritairement étudiés chez *C. albicans* et *S. cerevisiae*.

Chez *C. albicans*, plus de 50 facteurs de transcription ont été liés à la formation de biofilm (Lohse *et al.*, 2018). Les études utilisant des collections de mutants de délétion de *C. albicans* ont permis d'identifier des régulateurs de transcription qualifiés de « centraux », qui sont au cœur de la régulation de la formation de biofilm (Fox *et al.*, 2015; Nobile *et al.*, 2012). Ces régulateurs de transcription centraux forment un réseau de transcription hautement interconnecté dans lequel les facteurs se contrôlent mutuellement et, en outre, contrôlent plus d'un milliers de gènes cibles, incluant d'autres facteurs de transcription (Lohse *et al.*, 2018) (**Figure 19**).

Le mécanisme d'adhésion, intervenant à la fois dans les premières étapes de la formation du biofilm et pendant la maturation, fait intervenir des gènes spécifiques. Ces gènes, dont certains codent pour des adhésines (protéines de surface cellulaire), d'autres pour des facteurs de transcription, participent à l'adhésion des cellules (levures et filaments) entre elles et à des supports, mais également à la stabilité de l'adhésion au cours des différentes étapes (Finkel *et al.*, 2012; Gulati and Nobile, 2016; Li *et al.*, 2007; Li and Palecek, 2008; McCall *et al.*, 2019; Nobile *et al.*, 2006b, 2006a). Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'expression de certains gènes peut être diminuée en présence de farnésol, QSM inhibitrice de la formation de biofilm (Ramage *et al.*, 2002).

D'autres études ont également montré le rôle de deux facteurs de transcription dans la production de matrice, l'un favorise la production de matrice (par le biais de l'expression de *FKSI* qui catalyse la formation de β -1,3-glucane) (Nett *et al.*, 2011), l'autre réduisant l'accumulation de matrice, par l'activation et la répression de l'expression d'autres gènes (Nobile *et al.*, 2009).

Les filaments, éléments caractéristiques des biofilms de levures, ont un important rôle structurant. Il n'est donc pas surprenant que des gènes impliqués dans la croissance filamenteuse soient également nécessaires au développement du biofilm, incluant notamment des facteurs de transcription centraux (Cavalheiro and Teixeira, 2018; Fox *et al.*, 2015; García-Sánchez *et al.*, 2004; Uppuluri *et al.*, 2010b).

L'étape de dispersion permet au biofilm de libérer des cellules qui pourront initier la formation de nouveau biofilm et ainsi coloniser l'environnement. Trois facteurs de transcription ont été décrits comme favorisant ou inhibant la dispersion de cellules du biofilm (Lohse *et al.*, 2018; Uppuluri *et al.*, 2010b, 2010a).

Enfin, les transporteurs Cdr1, Cdr2 et Mdr1 sont apparus comme le principaux contributeurs

de la résistance des biofilms de *C. albicans* à divers agents antifongiques (Cavalheiro and Teixeira, 2018; Chandra and Mukherjee, 2015).

L'ensemble des études menées ont permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans les différentes étapes de la vie d'un biofilm, bien que la fonction de nombreuses protéines codées reste encore inconnue (Lohse *et al.*, 2018)

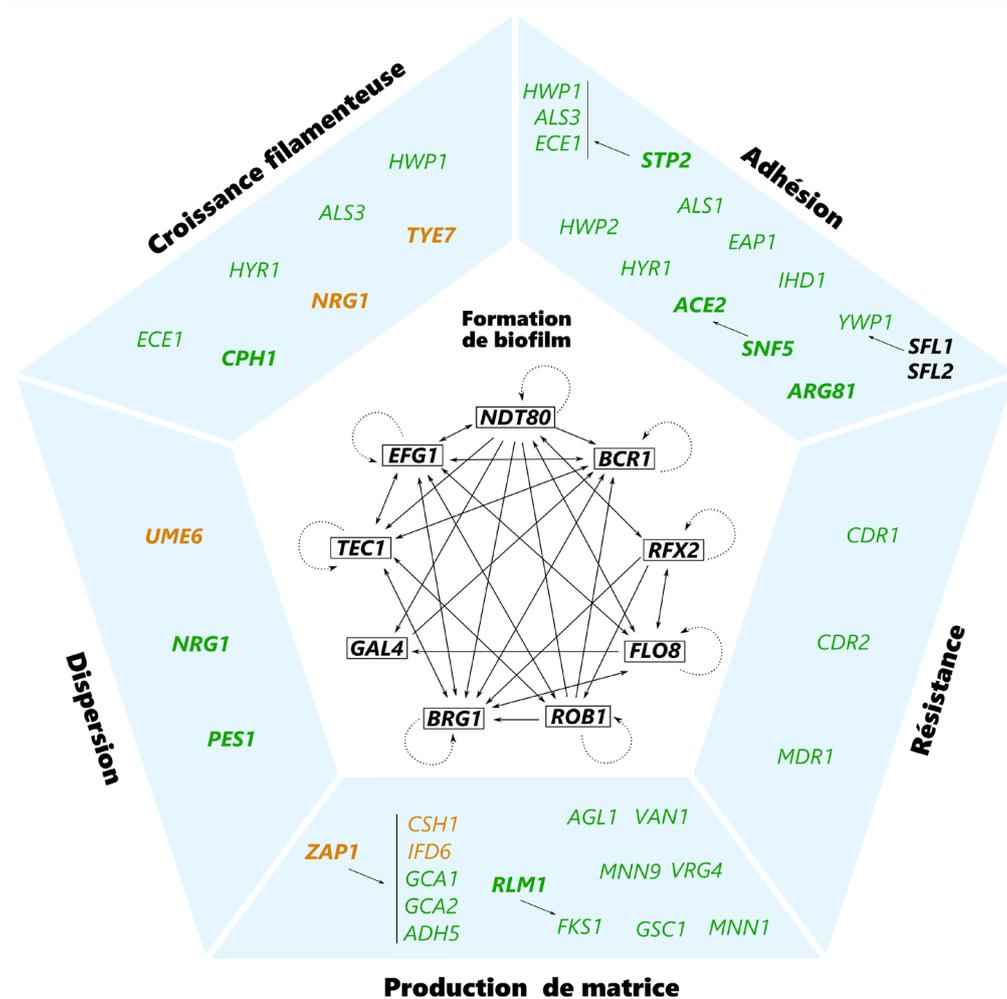


Figure 19. Exemples de gènes impliqués dans la formation de biofilm chez *Candida albicans*. Au centre, les régulateurs de transcription centraux impliqués la formation de biofilm forment un réseau et contrôlent des gènes ciblent classés selon leur implication dans le biofilm : croissance filamenteuse, adhésion, résistance, production de matrice, dispersion. Les gènes peuvent favoriser ou réduire la fonction associée. Parmi les gènes, sont représentés en gras, codant pour des facteurs de transcription. Des régulations ont été identifiés entre certains gènes et sont représentées par des flèches. Adapté de Lohse *et al.*, 2018.

Chez *S. cerevisiae*, la famille des gènes *FLO*, impliquée dans la formation de biofilm, est largement étudiée. Les gènes *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* et *FLO10* codent pour des glycoprotéines de surface impliquées dans l'adhésion des cellules aux surfaces et entre elles notamment lors de la formation de floes (Govender *et al.*, 2008; Verstrepen and Klis, 2006; Yang *et al.*, 2018).

L'expression des gènes *FLO1*, *FLO5* et *FLO9* dans le cadre de la formation de biofilm est régulée par le facteur de transcription Mig1, acteur dans la voie de répression du glucose (Yang *et al.*, 2018). Un autre gène de la famille *FLO* est le gène *FLO11*, très étudié pour son implication dans l'adhésion des cellules entre elles, aux surfaces, dans la formation de biofilm air-liquide et de mat, ainsi que dans la croissance filamenteuse (Govender *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2000; Ishigami *et al.*, 2004; Reynolds and Fink, 2001; Zara *et al.*, 2005). De plus, l'expression de ce gène augmente l'hydrophobicité des cellules qui semble favoriser la formation de floes et de voiles (Govender *et al.*, 2008; Zara *et al.*, 2005). L'expression du gène *FLO11* a fait l'objet de plusieurs études qui ont permis de montrer qu'elle pouvait être régulée par de nombreux facteurs (Andersen *et al.*, 2014; Coi *et al.*, 2017; Ishigami *et al.*, 2004; Kuchin *et al.*, 2002; Van Nguyen *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2018). La régulation du gène *FLO11* répond notamment à différents facteurs environnementaux par divers mécanismes, tels que la voie MAPK, la voie AMPc-PKA et la voie TOR (**Figure 20**) (Karunanithi *et al.*, 2012; Vinod *et al.*, 2008). La régulation des gènes impliqués dans la formation est notamment liée aux facteurs environnementaux. Par exemple, la formation de biofilm et l'expression du gène *FLO11* chez *S. cerevisiae* est favorisée par des carences nutritionnelles (par exemple, azote et glucose) (Bojsen *et al.*, 2012; Van Nguyen *et al.*, 2020; Zara *et al.*, 2011, 2010).

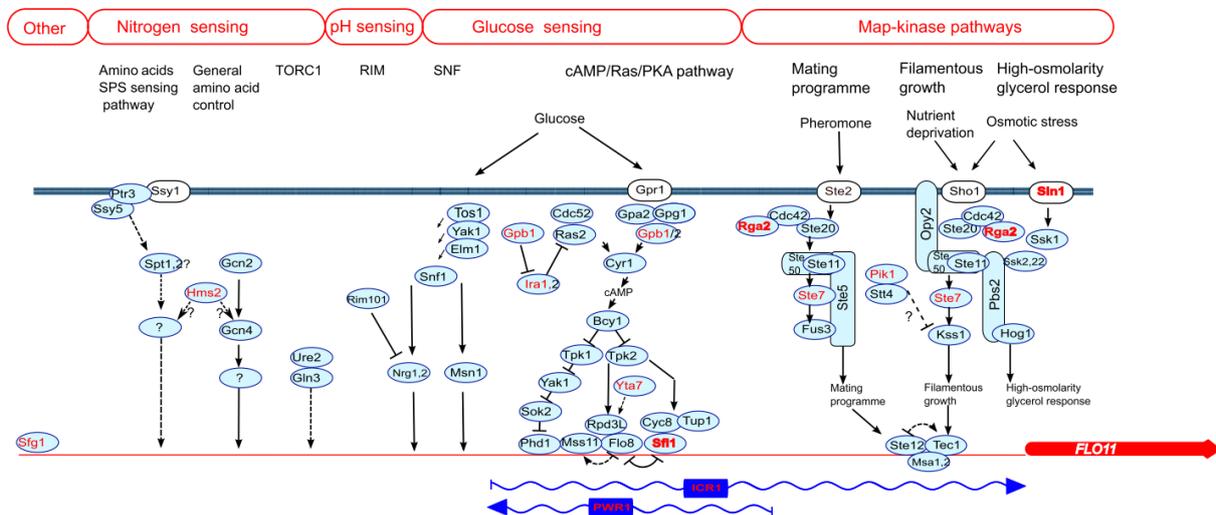


Figure 20. Représentation schématique des multiples réseaux impliqués dans la régulation du gène *FLO11* (Coi *et al.*, 2017).

Concernant *B. bruxellensis*, bien qu'il ait été montré qu'elle pouvait exprimer certains gènes, comme *SNF1* (Nardi *et al.*, 2010), aucun gène n'a été mis en relation avec sa capacité à former des biofilms.

6.2. La croissance invasive

Chez *S. cerevisiae*, la formation de biofilm semble partager des programmes génétiques communs avec d'autres phénotypes, comme la formation de mats, la croissance filamenteuse et la croissance invasive (Andersen *et al.*, 2014). Une étude a montré que parmi 71 mutants de délétion qui ont perdu la capacité à former des biofilms, 49 ont également perdu la capacité à former des mats et à réaliser une croissance invasive (**Figure 21**). Plusieurs gènes ont pu ainsi être identifiés, tels que *AVT1*, *FLO8*, *MSSI*, *MIT1*, *NPRI*, *RGT1*, *RIM8*, *TEC1*, impliqués dans diverses voies de signalisation. En particulier, la majorité de ces gènes sont impliqués dans la régulation d'un même gène, *FLO11*, bien connu et décrit (voir Partie 2, paragraphe 6.1).

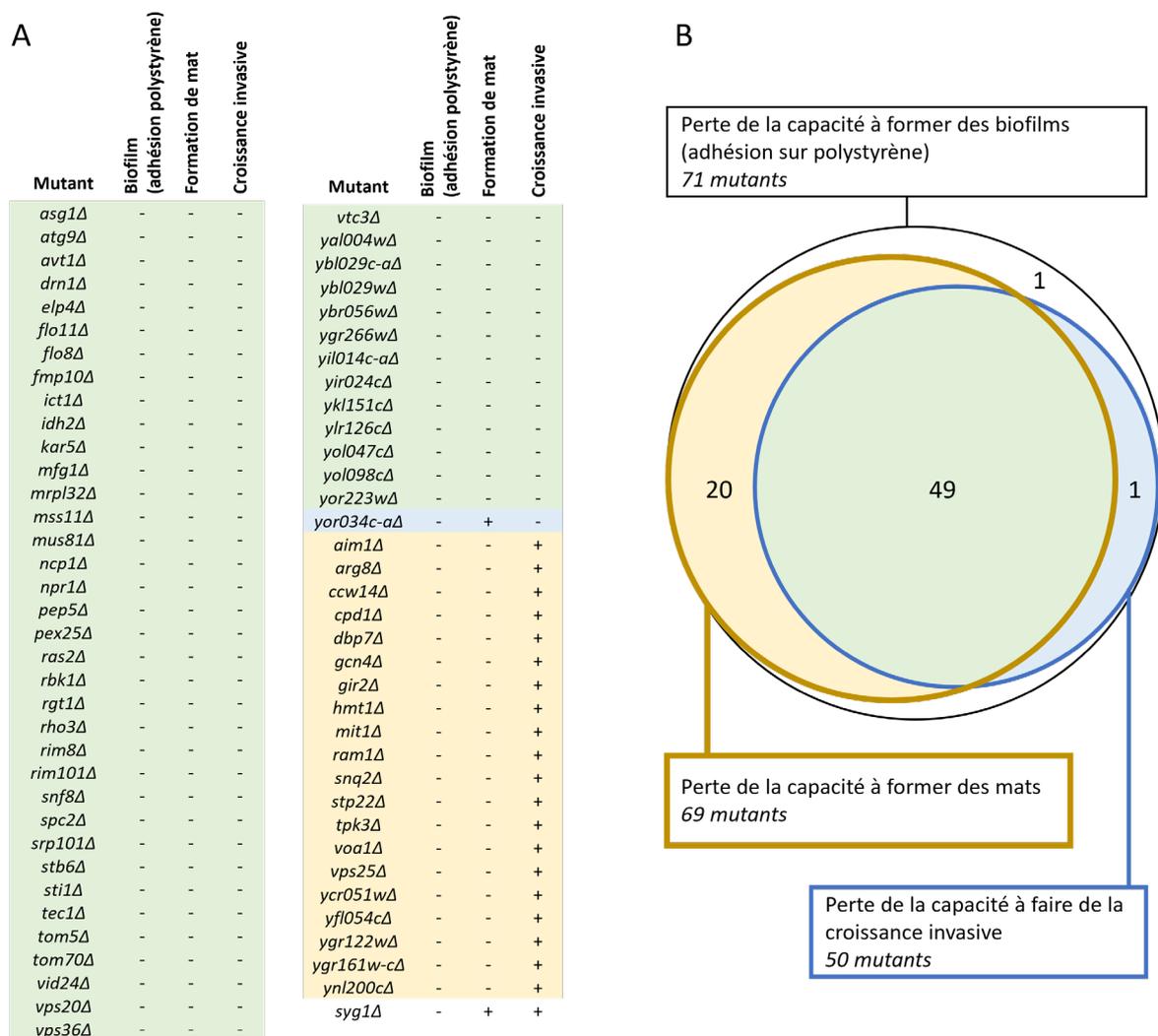
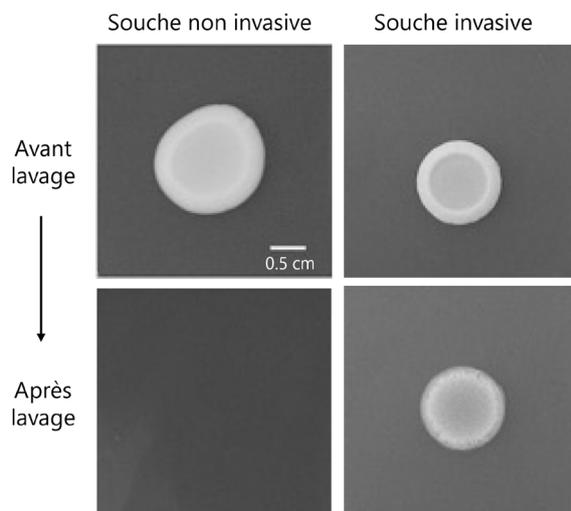


Figure 21. (A) Liste des phénotypes des mutants de délétion qui ont perdu la capacité à faire des biofilms. (B) Diagramme des mutants de délétion qui ont perdu la capacité à faire des biofilms, des mats et de la croissance invasive. Adapté de Andersen *et al.*, 2014.

En plus de la similitude d'un point de vue génétique, l'ensemble de ces phénotypes est dépendant de la disponibilité en nutriments dans le milieu. En effet, plusieurs études ont identifié les carences nutritionnelles ou la faible disponibilité en nutriments comme des facteurs déclencheurs de l'adhésion de cellules à des surfaces abiotique, de la formation de mats, de la croissance filamenteuse ainsi que de l'invasion (Cullen and Sprague, 2012; Dickinson, 2008; Reynolds *et al.*, 2008; Reynolds and Fink, 2001). De ce fait, l'ensemble de ces phénotypes est reconnu pour conférer aux micro-organismes la capacité de s'adapter à des environnements défavorables, notamment où la disponibilité en nutriments est limitée. Compte tenu des fortes similitudes entre ces phénotypes (voies de signalisation, facteurs déclencheurs), il est admis qu'une meilleure compréhension de l'un de ces phénotypes, offre l'opportunité d'apporter de nouvelles connaissances sur les autres.

Ainsi, il est tout à fait probable que les conditions nutritionnelles favorables à la croissance invasive chez un micro-organisme favorisent également la formation de biofilm. La croissance invasive est un phénotype qui reflète la capacité d'un micro-organisme à se développer à l'intérieur d'un milieu gélosé : après croissance d'une culture sur gélose, la surface de la gélose est lavée pour éliminer la culture en surface et mettre en évidence la partie de la culture qui a pénétré et envahi la gélose (**Figure 22**) (Cullen, 2015).

A Vue de dessus



B Vue latérale

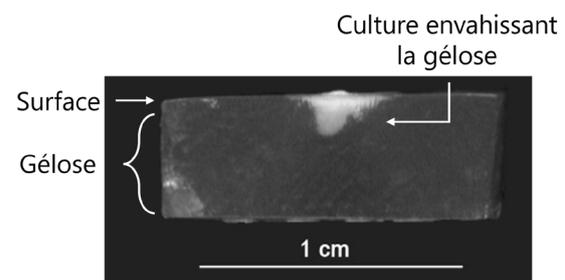


Figure 22. Exemples de croissance invasive chez *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Vue de dessus de culture avant et après lavage de la surface de la gélose pour une souche invasive et une souche non invasive - Photographies issues de Sidari *et al.*, 2014. (B) Vue de côté d'une culture ayant envahi la gélose - Photographie issue de Zupan and Raspor, 2008.

La croissance invasive (aussi appelée invasion, capacité d'invasion de gélose, capacité de pénétration de l'agar), a notamment été étudié chez *S. cerevisiae* (Bauer and Pretorius, 2001; Carstens *et al.*, 1998; Cullen and Sprague, 2000; Gimeno *et al.*, 1992; Tek *et al.*, 2018). La capacité d'invasion a été en partie corrélée chez *C. albicans* et *S. cerevisiae* à la capacité d'adhésion, caractéristique essentielle pour la formation de biofilm (Dunn *et al.*, 2020; Hope and Dunham, 2014). De plus, l'invasion, induite lors de carences nutritionnelles, est souvent associée à la filamentation (de même que pour la formation de biofilm), bien que ce ne soit pas un prérequis (Ceccato-Antonini and Sudbery, 2004). Par exemple, chez *C. albicans*, le processus d'infection comporte l'invasion des cellules épithéliales de l'intestin de l'hôte par des cellules filamenteuses, étape affectée par de multiples facteurs environnementaux (Desai, 2018). Afin d'étudier l'invasion des tissus de l'hôte par *C. albicans*, des protocoles d'invasion d'agar ont été utilisés en substitution pour obtenir rapidement des résultats préliminaires sur un grand nombre de souches et de milieux (Dunn *et al.*, 2020; Naseem *et al.*, 2020, 2019; Warena *et al.*, 2003). Au vu de l'ensemble de ces informations, étudier l'impact potentiel de conditions environnementales sur la formation de biofilm chez *B. bruxellensis* et d'autres micro-organismes d'intérêt via la croissance invasive pourrait être un moyen rapide d'obtenir de nombreux résultats.

Objectifs de la thèse

Le développement de *Brettanomyces bruxellensis* est un problème majeur pour la filière vitivinicole. Il est primordial d'être en mesure de prévenir son développement et de l'éliminer le cas échéant. Cependant, cette levure d'altération est connue pour persister dans les environnements relatifs au vin et contaminer le vin de manière récurrente au cours du temps. En effet, *B. bruxellensis* présente de nombreuses stratégies qui lui permettent de résister aux stress afin de s'adapter et survivre dans son environnement. Une stratégie supplémentaire mise en place par cette levure serait la formation de biofilm, un mode de vie à part entière, bien connu pour permettre aux micro-organismes qui le composent de mieux résister aux stress. Cependant, les données sur le mode de vie biofilm chez *B. bruxellensis* sont actuellement limitées comme décrit dans l'état de l'art présenté.

Ainsi, ce projet de thèse vise à approfondir les connaissances sur le mode de vie biofilm de la levure d'altération *B. bruxellensis*. Différents axes de recherche ont été développés au cours de ce travail de thèse. Ainsi, les résultats de ce manuscrit sont structurés en trois chapitres incluant des articles scientifiques.

Un avant-propos fournit le détail du matériel biologique utilisé dans ce projet.

Dans le premier chapitre, le mode de vie biofilm chez la levure *B. bruxellensis* a été caractérisé après validation de critères intrinsèques à la définition d'un biofilm. Pour ce faire, les capacités d'adhésion ainsi que l'architecture et composants du biofilm (matrice, morphotypes) ont été étudiés dans différentes conditions (milieux, support, souches).

Il est connu que l'établissement d'un biofilm est fortement influencé par les conditions environnementales, et notamment les conditions nutritionnelles. Ainsi, afin d'identifier les conditions favorables ou non à la formation de biofilm de *B. bruxellensis*, le second chapitre de ce travail porte sur l'impact de différentes conditions nutritionnelles. Chez les levures, la formation de biofilm partage des caractéristiques communes avec plusieurs phénotypes dont la capacité d'invasion de gélose. L'étude de ce phénotype permet une analyse simple et rapide mais n'a jamais été décrit chez l'espèce *B. bruxellensis*. Ainsi, l'impact des sources nutritionnelles a d'abord été évalué sur la capacité d'invasion de *B. bruxellensis* afin de sélectionner certaines conditions pouvant potentiellement favoriser l'adhésion et/ou la formation de biofilm. L'impact de ces conditions sur la capacité d'adhésion de *B. bruxellensis* a donc ensuite été étudié.

Au cours de ce projet de thèse, une variabilité de la morphologie cellulaire a été mise en évidence entre les souches appartenant à des groupes génétiques différents, comme déjà décrit

dans la littérature pour d'autres phénotypes. En particulier, la résistance au SO₂ de souches de *B. bruxellensis* a précédemment été corrélée aux groupes génétiques décrits au sein de l'espèce. Ainsi, il paraît important de disposer d'outil de discrimination intraspécifique pour prédire l'adaptabilité d'un isolat à certains facteurs environnementaux. Pour ce faire, une méthode moléculaire (RAPD-PCR) a été adaptée pour la discrimination intraspécifique chez l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* dans le troisième chapitre. De plus, une autre piste non moléculaire a été explorée afin de simplifier la discrimination. Elle consiste à exploiter le potentiel lien entre le polymorphisme cellulaire et les groupes génétiques, via l'utilisation d'une méthode de « deep learning » pour prédire le groupe génétique d'un isolat à partir d'observations microscopiques.

Ce manuscrit s'achève par un bilan des principales avancées de ce projet et l'exploration des perspectives associées.

Matériel biologique
et conditions de culture

Matériel biologique

Pour ce travail de thèse, 75 isolats et souches de *Brettanomyces bruxellensis* ont été étudiées (Tableau 7), issus de diverses collections et du travail de thèse de Hany Abdo (2020). Ces individus ont été isolés du vin et des différents environnements liés au vin sur plusieurs années et dans plusieurs régions géographiques.

Conditions de culture

Lors de l'étude du biofilm, nous nous sommes toujours attachées à garantir une reproductibilité entre les essais réalisés. Pour cela, les cellules ont été cultivées dans les mêmes conditions afin d'assurer un état physiologique similaire (fin de phase exponentielle/début de phase stationnaire) entre les cultures utilisées pour l'inoculation des cultures en biofilms. Le protocole mis en place pour l'étude de la formation de biofilm est basé sur un protocole développé précédemment au laboratoire et adapté à la levure *B. bruxellensis* au cours de ce projet de thèse.

Pour les expériences menées en vin, les cellules ont été adaptées aux conditions du vin avant utilisation selon un protocole également établi au laboratoire.

Tableau 7. Liste des isolats (numérotés de 1 à 65) et des souches (AWRI1499, CDR3, CDR9, CDR11, CDR12, CDR217, CDR219, LO2E2, LO417, LO6/036) de *Brettanomyces bruxellensis* utilisés dans ce projet de thèse. *ND* : non disponible. (Suite page suivante)

Isolats/Souche	Région géographique d'isolement	Environnement/Matrice d'isolement	Année d'isolement	Collection / Etude
1	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
2	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
3	Bourgogne, France	Matériel vinaire	2016	Thèse Hany ABDO
4	Bourgogne, France	Matériel vinaire	2016	Thèse Hany ABDO
5	Bourgogne, France	Matériel vinaire	2016	Thèse Hany ABDO
6	Bourgogne, France	Matériel vinaire	2016	Thèse Hany ABDO
7	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
8	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
9	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
10	Bourgogne, France	Matériel vinaire	2016	Thèse Hany ABDO
11	Bourgogne, France	Matériel vinaire	2016	Thèse Hany ABDO
12	Bourgogne, France	Matériel vinaire	2016	Thèse Hany ABDO
13	Bourgogne, France	Matériel vinaire	2016	Thèse Hany ABDO
14	Bourgogne, France	Matériel vinaire	2016	Thèse Hany ABDO
15	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
16	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
17	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
18	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
19	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
20	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
21	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
22	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
23	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
24	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
25	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO

Tableau 7 (suite). Liste des isolats (numérotés de 1 à 65) et des souches (AWRI1499, CDR3, CDR9, CDR11, CDR12, CDR217, CDR219, LO2E2, LO417, LO6/036) de *Brettanomyces bruxellensis* utilisés dans ce projet de thèse. *ND* : non disponible.

Isolats/Souche	Région géographique d'isolement	Environnement/Matrice d'isolement	Année d'isolement	Collection / Etude
26	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
27	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
28	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
29	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
30	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
31	Bourgogne, France	Fût	2016	Thèse Hany ABDO
32	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
33	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
34	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
35	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
36	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
37	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
38	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
39	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
40	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
41	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
42	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
43	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
44	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
45	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
46	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
47	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
48	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
49	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
50	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
51	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
52	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
53	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
54	Bourgogne, France	Vin	2016	Thèse Hany ABDO
55	Bourgogne, France	Matériel vinaire	2016	Thèse Hany ABDO
56	Bourgogne, France	Matériel vinaire	2016	Thèse Hany ABDO
57	Bourgogne, France	Matériel vinaire	2016	Thèse Hany ABDO
58	Bourgogne, France	Vin	2016	IFV
59	Bourgogne, France	Vin	2015	IFV
60	Bourgogne, France	Vin	2015	IFV
61	Pays de la Loire, France	Vin	<i>ND</i>	NEXIDIA
62	Pays de la Loire, France	Vin	<i>ND</i>	NEXIDIA
63	Bourgogne, France	Vin	<i>ND</i>	NEXIDIA
64	Bourgogne, France	Vin	<i>ND</i>	NEXIDIA
65	Bourgogne, France	Vin	<i>ND</i>	NEXIDIA
AWRI1499	Australie	Vin	2002	AWRI
CDR3	Cotes-du-Rhone, France	Vin	2012	InterRhône
CDR9	Cotes-du-Rhone, France	Vin	2012	InterRhône
CDR11	Cotes-du-Rhone, France	Vin	2012	InterRhône
CDR12	Cotes-du-Rhone, France	Vin	2012	InterRhône
CDR217	Cotes-du-Rhone, France	Vin	2003	InterRhône
CDR219	Cotes-du-Rhone, France	Vin	2003	InterRhône
LO2E2	Bourgogne, France	Vin	<i>ND</i>	IUVV
LO417	Bordeaux, France	Vin	2004	CRB Œnologie
LO6/036	Bourgogne, France	Vin	<i>ND</i>	IUVV

Collections

IFV : Institut Français de la Vigne et du Vin, Beaune, France

NEXIDIA : Dijon, France

AWRI : Australian Wine Research Institute, Glen Osmond, SA, Australie

InterRhône : Orange, France

IUVV : Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Dijon, France

CRB Œnologie : Centre de Ressources Biologiques Œnologie, Bordeaux, France

Chapitre 1

Etude de la formation de biofilm
chez *Brettanomyces bruxellensis*

Contexte scientifique

Le biofilm est une mode de vie permettant aux cellules qui le composent de bénéficier d'une résistance accrue aux stress environnementaux (Chandra and Mukherjee, 2015; Flemming and Wingender, 2010). Ainsi, les biofilms deviennent problématiques dans le cas de micro-organismes d'altération et/ou pathogènes qui peuvent potentiellement mieux persister dans l'environnement via cette stratégie. Dans l'industrie agro-alimentaire, les biofilms peuvent représenter une source de contamination récurrente des aliments et sont donc un véritable challenge sanitaire et économique (Abdallah *et al.*, 2014; Zara *et al.*, 2020).

La levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis* a été isolée sur diverses surfaces dans l'industrie agro-alimentaire (Abdo, 2020; Oro *et al.*, 2019; Suiker *et al.*, 2021) ou au sein de biofilms associés à des produits fermentés (David-Vaizant and Alexandre, 2018; Harrison and Curtin, 2021). Cependant, peu d'études se sont intéressées à la caractérisation des biofilms formés par *B. bruxellensis* et se sont principalement focalisées sur la quantification de cellules adhérees (de 5 heures à 15 jours) sans décrire la structure du biofilm (Dimopoulou *et al.*, 2019; Joseph *et al.*, 2007; Poupault, 2015; Tristezza *et al.*, 2010). Seul Poupault (2015) a décrit par microscopie confocale différentes capacités d'adhésion avec des structures 3D. Néanmoins, comme nous l'avons vu dans l'état de l'art, d'autres critères que l'adhésion nécessitent d'être validés pour répondre à la définition d'un biofilm, comme la présence de matrice. Ainsi, dans ce chapitre, nous avons réalisé des observations microscopiques de la structure du biofilm et des types cellulaires le composant afin d'apporter de nouveaux éléments en faveur de la description d'un mode de vie biofilm chez *B. bruxellensis*. De plus, la capacité de différentes souches à adhérer et à croître en biofilm a été examinée dans diverses conditions (supports, milieux) notamment en lien avec l'environnement vinicole. Nous avons également étudié l'impact du vin sur un biofilm déjà formé et évalué la production de 4-éthylphénol dans le cadre du mode de vie biofilm chez *B. bruxellensis*.

Les résultats de ce chapitre sont présentés sous forme d'un article scientifique (Partie 1) et de résultats complémentaires (Partie 2).

Partie 1. New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life

Article



Received: 13 September 2019; Accepted: 25 November 2019; Published: 28 November 2019

DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464

Manon Lebleux^{a,1}, Hany Abdo^{a,1}, Christian Coelho^b, Louise Basmacıyan^a, Warren Albertin^c, Julie Maupeu^d, Julie Laurent^a, Chloé Roullier-Gall^a, Hervé Alexandre^a, Michèle Guilloux-Benatier^a, Stéphanie Weidmann^a, Sandrine Rousseaux^{a,*}

^a Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, Laboratoire VAlMiS-IUVV, Dijon, France

^b Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, Laboratoire PCAV, Dijon, France

^c USC 1366 INRA, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Unité de Recherche Œnologie EA 4577, University of Bordeaux, Bordeaux, France

^d Microflora-ADERA, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Unité de Recherche Œnologie EA 4577, Bordeaux, France

¹ Manon Lebleux and Hany Abdo contributed equally to this work

* Corresponding author

Abstract: The wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* can be found at several steps in the winemaking process due to its resistance to multiple stress conditions. The ability to form biofilm is a potential resistance strategy, although it has been given little attention so far for this yeast. In this work, the capacity to form biofilm and its structure were explored in YPD medium and in wine. Using microsatellite analysis, 65 isolates were discriminated into 5 different genetic groups from which 12 strains were selected. All 12 strains were able to form biofilm in YPD medium on a polystyrene surface. The presence of microcolonies, filamentous cells and extracellular polymeric substances, constituting the structure of the biofilm despite a small thickness, were highlighted using confocal and electron microscopy. Moreover, different cell morphologies according to genetic groups were highlighted. The capacity to form biofilm in wine was also revealed for two selected strains. The impact of wine on biofilms was demonstrated with firstly considerable biofilm cell release and secondly growth of these released biofilm cells, both in a strain-dependent manner. Finally, *B. bruxellensis* has been newly described as a producer of chlamyospore-like elements in wine, for both planktonic and biofilm lifestyles.

Keywords: *Brettanomyces*; Spoilage microorganism; Microcolonies; Chlamyospore; Wine

1. Introduction

Biofilms are complex associations of single- and multiple- species interconnected cells embedded in a hydrated self-produced matrix established at a solid/liquid or liquid/air interfaces (Alexandre, 2013; Costerton *et al.*, 1995; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Kolter and Greenberg, 2006). Biofilm development is a dynamic process including the key steps of the adhesion and maturation of microcolonies in a three-dimensional structure, and detachment during which cells acquire a particular phenotype (Flemming and Wingender, 2010; Sauer *et al.*, 2002). Extracellular polymeric substances (EPS) produced throughout biofilm development are mainly composed of polysaccharides, proteins, extracellular DNA (eDNA) and lipids (Flemming, 2016; Jachlewski *et al.*, 2015; Zarnowski *et al.*, 2014) and can be present at various quantities dependent on environmental conditions, the age of the biofilm and the type of microorganisms involved (Mayer *et al.*, 1999). Biofilm mode of life allows microorganisms to better adapt to environmental conditions through metabolic cross-feeding, cell-cell interactions and especially chemical and physical resistance (Bastard *et al.*, 2016; Davey and O'toole, 2000; O'Connell *et al.*, 2006). This growth strategy, through surface colonization and the increase of stress resistance, contributes to the persistence of microorganisms in different environments, such as those encountered in the food industry (Coenye and Nelis, 2010; Møretrø and Langsrud, 2017). In some cases, biofilms are used for increased microorganism performance, for example in the production of ethanol (Germec *et al.*, 2016), their involvement in fermentation processes and persistence in the wine environment (Bastard *et al.*, 2016; Tek *et al.*, 2018). However, many studies have investigated the presence of biofilms, especially in the case of negative effects due to the risk of recurrent contamination of food and raw materials by pathogenic or spoilage species (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2019; Bridier *et al.*, 2015). By studying biofilms present on the process surfaces of breweries, different spoilage microorganisms as *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida pelliculosa* were isolated (Timke *et al.*, 2004, 2008).

In the wine industry, one of the most feared spoilage microorganisms is the yeast *Brettanomyces bruxellensis*. This yeast is responsible for the production of volatile phenols and most importantly 4-ethylphenol, which contributes to undesirable aromas described as “Brett character” (Chatonnet *et al.*, 1992; Oelofse *et al.*, 2008; Wedral *et al.*, 2010), leading to rejection by consumers and to heavy economic losses (Fugelsang, 1997; Lattey *et al.*, 2010). This yeast can be found at several steps in the winemaking process (Chatonnet *et al.*, 1992; Renouf *et al.*, 2006, 2009; Renouf and Lonvaud-Funel, 2007; Rubio *et al.*, 2015; Suárez *et al.*, 2007) due to its resistance to multiple stress conditions (Avramova *et al.*, 2018b; Conterno *et al.*, 2006; Longin *et al.*, 2016; Schifferdecker *et al.*, 2014; Serpaggi *et al.*, 2012; Smith and Divol, 2016). The ability to form biofilm is another potential resistance strategy (Tek *et al.*, 2018; Verstrepén and Klis, 2006), although in the case of *B. bruxellensis* it has been given only little attention so far. Up to now, few studies have demonstrated the capacity of several strains of *B. bruxellensis* to adhere on several surfaces (Ishchuk *et al.*, 2016; Joseph *et al.*, 2007; Kregiel *et al.*, 2018; Poupault, 2015; Tristezza *et al.*, 2010). Thus, Joseph *et al.* (2007) pinpointed for the first time the capacity

of *B. bruxellensis* isolates to adhere and form a biofilm-like structure on polystyrene surfaces; also, the biofilm structures were not described. Moreover, the efficiency of adhesion and biofilm-like formation depend on the nutritional environment (Kregiel *et al.*, 2018; Tristezza *et al.*, 2010). Although these studies demonstrated the ability of *B. bruxellensis* to adhere and form a biofilm-like film, there is a lack of microscopic observations of these biofilm-like structures in synthetic media and in wine. Such observations would highlight the three-dimensional structure of the film and EPS production. Using confocal microscopy, Poupault (2015) was alone in describing different adhesion capacities with three-dimensional structures on polystyrene. Therefore, it seems necessary to deepen knowledge on the adhesive and biofilm formation capacities of *B. bruxellensis*, and to demonstrate its ability to form a biofilm (*i.e.* thickness, presence of microcolonies, EPS) on different surfaces in view to achieving better subsequent removal of this microbial species from winemaking material.

In this context, the purpose of our study was to: (i) investigate the kinetics of biofilm formation of *B. bruxellensis* strains; (ii) visualise the biofilm structure and morphology of cells by microscopic observations; and (iii) investigate the behaviours of biofilm in wine.

2. Materials and methods

2.1. Yeast isolates

A total of 65 isolates belonging to the yeast *B. bruxellensis* were used in this study. These isolates were obtained from enological materials (*i.e.* from barrels, taps, pipes, transfer tanks) and/or wine from a winery. The yeasts were stored at -80 °C in YPD liquid medium (0.5% w/v yeast extract (Biokar, Beauvais, France), 1% w/v bactopectone (Biokar), 2% w/v D-glucose (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) and 0.02% w/v chloramphenicol (Sigma, St Louis, USA)), containing 20% (v/v) glycerol.

2.2. Genotyping by microsatellite analysis

DNA extraction of *B. bruxellensis* strains and PCR conditions for the microsatellite markers amplification and the amplicon analysis were performed according to Albertin *et al.*, 2014 and Avramova *et al.*, 2018a. Briefly, twelve microsatellite regions were amplified from the DNA of the 65 isolates, then fragment length was analyzed by capillary electrophoresis on an ABI 3130 XL sequencing machine (Albertin *et al.*, 2014). A number of repeated patterns for each microsatellite region analyzed were associated for each isolate. The diversity of the isolates studied was determined according to the variability of the number of repetitions.

To investigate the genetic relationships between strains, the microsatellite data-set was analyzed using the *Poppr* package in R. A dendrogram was established using Bruvo's distance and Neighbour Joining (NJ) clustering (Bruvo *et al.*, 2004; Kamvar *et al.*, 2014; Paradis *et al.*, 2004). Bruvo's distance takes into account the mutational process of microsatellite loci and is well adapted to populations with mixed ploidy levels and is

therefore, suitable for the study of the *B. bruxellensis* strain collection used in this work.

Clones were defined as isolates displaying the same genotype for all 12 microsatellite markers tested, allowing the generation of clonal groups.

2.3. Biofilm formation in YPD medium

2.3.1. YPD cultures

Using cultures stored at -80°C , starter cultures were prepared in triplicate in 5 mL of YPD medium at 28°C for 6 days. Then, the starter cultures were passed twice into fresh medium to obtain cultures in the same physiological state. Then, cell suspensions were readjusted at $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.05$ ($1 \text{ OD}_{600\text{nm}} = 1.0 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$) in YPD medium to obtain the “YPD working culture”.

2.3.2. Biofilm formation on polystyrene plates

Twelve strains were selected from the 5 genetic groups, taking into account the distribution of the clonal groups. For each of the 12 strains selected, the biofilm formation on the polystyrene microplate was evaluated according to (Rieu *et al.*, 2007) and adapted to the yeast. One mL of the “YPD working culture” was inoculated in 3 technical and 3 biological repetitions in a 24-well polystyrene plate from Costar® (Corning Incorporated, New-York, USA) at 28°C . After 48 h and 7, and 14 days (with medium turnover every 3.5 days), the wells were carefully washed twice with 500 μL of sterile physiological water (0.9% NaCl) to eliminate non-adhered cells. With the addition of 1 mL of sterile physiological water, the adhered cells were detached by strong pipetting with 15 backflows. The detached cells were estimated by numbering on YPD plates (YPD broth with 2% *w/v* agar) at 28°C after serial dilutions.

2.4. Biofilm formation in wine

2.4.1. Wine used

The wine used was elaborated from the Pinot Noir grape variety (Marsannay, 2018 vintage). This red wine was characterized by 11.20% (v/v) ethanol and a pH of 3.45. The wine was filtered and sterilized using a vacuum driven filtration system through a 0.22 μm sterile membrane (Stericup-GP, polyethersulfone, SCGPU05RE, Millipore Express® Plus Membrane).

2.4.2. Culture adaptation

Two different strains with significantly different numbers of adhered cells on polystyrene in YPD medium at 14 days (strains 11 and 14) were selected to study biofilm formation in wine. Before planktonic cell incubation in wine, the cells were adapted in wine as previously described (Longin *et al.*, 2016). Using cultures stored at -80°C , starter cultures were prepared in triplicate in YPD medium at 28°C for 6 days. Cultures were therefore incubated in 10 mL of YPD medium supplemented with 5% (v/v) ethanol for 48 h. The $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of each culture was adjusted to 0.1 into a 50:50 (v/v) wine:water solution. After wine adaptation, the cell concentration was readjusted to $5.0 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$ in the wine to obtain the “wine working culture”.

2.4.3. Biofilm formation on stainless steel chips in wine

The biofilm formation of *B. bruxellensis* in wine was studied on stainless steel chips using a protocol previously described (Bastard *et al.*, 2016) and adapted to the yeasts. Briefly, stainless-steel chips (25 mm × 25 mm, Goodfellow, 316L, France) were immersed in 13 mL of the “wine working culture” described in paragraph 2.4.2. and incubated at 28 °C. The yeast population was monitored on the chip (*i.e.* cells adhered and developed into biofilm): after 2, 24, 48 h, 7 and 14 days of incubation, the chips were collected and rinsed for 30 s in 13 mL of sterile physiological water to eliminate non-adhered cells on the chips. Afterwards, the chips were placed in new sterile physiological water (13 mL) and the cells were detached by sonication (3 min) (Branson CPXH1800H-E; Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, USA). For each time point, the cells detached from the chips were numbered by plating on YPD plates at 28 °C after serial dilutions. This experiment was performed in biological triplicates for each strain (*i.e.* 3 different “wine working cultures”).

2.4.4. Wine effect on 7 day-aged biofilms

For selected strains 11 and 14, the 7 day-aged biofilm formed on stainless-steel chips was obtained from the “YPD working culture” as previously described in paragraph 2.4.3. Then, the stainless-steel chips were placed in the sterile wine (13 mL) and the evolution of the yeast population on the chip (*i.e.* biofilm cells) and in the wine (*i.e.* planktonic cells, corresponding to cells released from biofilm over the time) was monitored. The 7 day-aged biofilm formed on stainless-steel chips was incubated at 28°C for 2, 24, 48 h and 7 and 14 days and treated as described in paragraph 2.4.3. For each time point, the cells detached from the chips and the cells contained in the wine were numbered by plating on YPD plates at 28 °C after serial dilutions. This experiment was performed in biological triplicates for each strain (*i.e.* 3 different “YPD working cultures”).

2.5. Cell observations

2.5.1. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

From the “YPD working culture”, 7 day-aged biofilms (with a medium turnover at 3.5 days) were formed in a 96-well polystyrene plate from Cellstar® (Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Austria). After 7 days, each well was carefully washed with 100 µL of MacIlvaine Buffer containing 2.83% w/v sodium phosphate dibasic (Sigma, St. Louis, USA), 2.10% w/v citric acid monohydrate (Sigma, St. Louis, USA) and adjusted at pH 4.0. Surface-associated cells were fluorescently tagged by adding 5(6)-Carboxyfluorescein Diacetate (cFDA) esterase activity marker (green; $\lambda_{ex} = 495 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$) at 7.5 µM (ThermoFisher, Illkrich, France) and the plate was placed in a dark place for 15 min.

The surface associated-cells were examined using a Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) inverted confocal laser scanning microscope at the DImaCell Plateform (<http://dimacell.fr/index.php>). Observations were performed using a 40×/1.25 oil immersion objective lens. CLSM was equipped with a solid 488 nm diode (laser power: 3%) and the fluorescence emitted was recorded from 500 to 554 nm using

a PMT detector with a gain of 790 V. The images were acquired by LAS X software (Leica Microsystems, Germany) at a resolution of 1024×1024 pixels, a scan speed of 400 Hz and a line average of 2. To assess the thickness of the structure and obtain 3D views, a series of optical sections at 1- μm intervals in the z-axis were taken throughout the full depth of the sample. The bright field channel was acquired simultaneously, using a second PMT detector. Subsequently, 3D reconstruction images of the biofilms were generated with LAS X software to obtain a top view for each strain.

ImageJ software was used to determine cell morphology and biofilm thickness from CLSM images. For the cell morphology, the length to width (l/w) ratio and cell area were determined from fifty measurements of single cells (Basmacıyan *et al.*, 2018). For biofilm thickness, 5 random cuts following the z-axis were performed for each of the strains studied and 10 measurements were made per cut (total 50 measurements by strain).

2.5.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Biofilms were formed on stainless steel chips from the “YPD working culture” (for 7 days) and from “wine working culture” (for 7 and 14 days). The cells were fixed directly on the stainless-steel chips by a solution of 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer of pH 7.2 for 3 h at 4 °C. The samples were then washed with 0.05 mM phosphate buffer for 10 min at room temperature. Dehydration was performed by two successive immersions for 10 min in solutions of increasing ethanol content (30, 50, 70, 90, 100%). Then, each mixture was placed in a bath of ethanol-acetone solution (70:30, 50:50, 30:70, 100%) for 10 min. The chips were then air-dried and stored at room temperature. Afterwards, the samples were coated with a thin gold layer using an Edwards Scancoat Six Pirani 201 sputter coater (Edwards High Vacuum, Crawley, England) and then observed with a Hitachi SU1510 scanning electron microscope (Hitachi High-Technologies Corporation, Japan). SEM was performed at an accelerating voltage of 15 kV using a working distance between 7.5 mm and 9.7 mm.

2.5.3. Epifluorescence microscopy

Planktonic cells were incubated from the “wine working culture” at 28 °C for 14 days. The cells were adhered on a microscope fluorescence slide and then fixed in methanol at room temperature for 5 min. The fungal cell wall was stained using the Fungi-Fluor® kit (calcofluor) (Polysciences, Inc., Warrington, PA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, samples were incubated for 5 min with the reagent and washed once in Phosphate Buffer Saline 1× before adding a coverslide. The slides were examined with a BX51 epifluorescence microscope (Olympus, Rungis, France) coupled with the “CellF” software and using an “UPlanFL 40×” objective.

2.6. Statistical analyses

All assays were performed in three biological replicates. Biomass and biofilm thickness data are expressed as means, assigned with the standard deviation. A one-way analysis of variance (ANOVA) with a post-hoc Tukey Honestly Significant Difference (HSD) test was used for statistical comparison. A p -value ≤ 0.05 was considered statistically significant. For cell morphology, the same test was used for the

comparison of areas A, B and C with p -values ≤ 0.01 .

3. Results

3.1. Biofilm structures

Sixty-five isolates of *B. bruxellensis* from enological materials (*i.e.* from barrels, taps, pipes, transfer tanks) and/or wine from a winery were discriminated by microsatellite analysis allowing their distribution in 5 of the 6 genetic groups (GG) described by Avramova *et al.*, 2018a. The majority of isolates belong to GG3 and none belongs to the GG5 (**Table 1.1**). Over all, 34 clonal groups were formed (each including isolates with a genetic distance equal to zero) (**Table 1.1**), allowing the selection of twelve strains distributed among the 5 genetic groups. Their ability to form biofilm in YPD medium was studied.

Table 1.1. Distribution of the 65 isolates among 34 clonal groups in the 6 genetic groups (GG) described by Avramova *et al.*, 2018a. None of the isolates belonged to the GG5.

Genetic groups	Clonal groups (isolates)													
GG1	1													
	14													
	25	27	49											
	26	30												
	61	62												
GG2	2													
	4	6	11	17	19									
	20													
GG3	3	10												
	5	42												
	7	28	54											
	8													
	9	44	55											
	12													
	13	15												
	16													
	18	38	46											
	21	22	23	29	34	35	36	39	40	43	47	48	64	
	24	37												
	31													
	32	52	53											
	33													
	41													
	45													
	50													
	51													
	56													
	57													
58														
59														
60														
GG4	63													
GG5	-													
GG6	65													

Biofilm formation kinetics was monitored in three independent biological replicates at 3 different time points: 48 h, 7 days and 14 days on polystyrene microplates for the 12 strains selected (**Table 1.2**). At 48 h, the different strains presented an average

adhered population around 3.3×10^6 CFU/cm², except strains 11, 20, 60 and 63, which had a statistically lower population around 5.5×10^5 CFU/cm². At 7 days, the adhered population distribution ranged between 6.9×10^5 and 6.3×10^6 CFU/cm². Statistically, strains 2 and 65 had a larger adhered population compared to strains 7, 9, 11, 14, 20, 36 and 63. At 14 days, the populations of the 12 strains reached an average biomass of 4.1×10^6 CFU/cm². Strain 11 presented a significantly lower quantity of adhered cells compared to strains 7, 9, 14, 20, and 36 (**Table 1.2**).

Table 1.2. Biofilm growth of the 12 selected strains in YPD medium on polystyrene plates. Cultures were initially inoculated at 5.0×10^5 CFU/mL. The values represent the average of three independent biological replicates, assigned with standard deviation (gray values). Different letters represent significant difference (ANOVA, Tukey HSD, p -value ≤ 0.05) obtained between the 12 strains at each time point.

Strain	CFU/cm ²								
	48 hours			7 days			14 days		
2	3.9×10 ⁶	±2.68×10 ⁵	a	6.1×10 ⁶	±9.69×10 ⁵	a	3.2×10 ⁶	±1.88×10 ⁵	ab
7	3.6×10 ⁶	±5.53×10 ⁵	a	2.5×10 ⁶	±5.87×10 ⁵	d	6.3×10 ⁶	±1.16×10 ⁶	a
9	3.1×10 ⁶	±9.45×10 ⁵	a	2.3×10 ⁶	±1.54×10 ⁵	d	4.7×10 ⁶	±1.14×10 ⁶	a
11	7.5×10 ⁵	±2.15×10 ⁵	bc	6.9×10 ⁵	±5.11×10 ⁴	e	2.4×10 ⁶	±1.02×10 ⁶	b
14	2.1×10 ⁶	±1.47×10 ⁶	ab	8.9×10 ⁵	±1.62×10 ⁵	e	5.3×10 ⁶	±6.50×10 ⁵	a
20	6.5×10 ⁵	±9.99×10 ⁴	c	2.8×10 ⁶	±6.93×10 ⁵	cd	5.4×10 ⁶	±7.02×10 ⁵	a
36	2.9×10 ⁶	±6.93×10 ⁵	a	3.3×10 ⁶	±5.81×10 ⁵	bcd	5.9×10 ⁶	±2.57×10 ⁶	a
49	4.6×10 ⁶	±1.44×10 ⁶	a	3.6×10 ⁶	±2.92×10 ⁵	abcd	3.3×10 ⁶	±1.02×10 ⁶	ab
60	6.6×10 ⁵	±2.02×10 ⁵	c	5.5×10 ⁶	±1.41×10 ⁶	ab	3.4×10 ⁶	±7.47×10 ⁵	ab
61	3.1×10 ⁶	±7.36×10 ⁵	a	4.5×10 ⁶	±6.78×10 ⁵	abc	3.2×10 ⁶	±3.43×10 ⁵	ab
63	1.5×10 ⁵	±6.10×10 ⁴	d	3.0×10 ⁶	±8.87×10 ⁵	cd	4.2×10 ⁶	±5.62×10 ⁵	ab
65	3.8×10 ⁶	±1.35×10 ⁵	a	6.3×10 ⁶	±2.36×10 ⁵	a	3.5×10 ⁶	±6.44×10 ⁵	ab

Seven day-aged biofilms for the 12 strains were observed by CLSM to investigate biofilm characteristics (**Figure 1.1**). CLSM observations showed cellular layers covering the entire surface for all the strains, except strain 63 which presented some uncovered areas. For this strain, the surface coverage seemed to be different with the development of microcolonies instead of cell layers spreading over the surface (**Figure 1.1A**).

Biofilm thickness was determined for each strain. Average thickness values were obtained from 50 measurements of random biofilm cuts of the representative views (**Figure 1.1A**). An average thickness of 9.45 μ m was measured throughout the 12 strains. Taken together, these data suggest that all the strains tested were able to develop in contact with a surface. It is also noteworthy that the thickness of the biofilm appears to be related to cell size (**Figure 1.1A**). Indeed, magnifications of the CLSM images performed for each strain allowed observing different cell shapes such as “round”, “lemon”, “rice grain” or “elongated” according to the considered strain (**Figure 1.1A**, **Table 1.3**). In addition, filamentous cells were observed (**Figure 1.1B**).

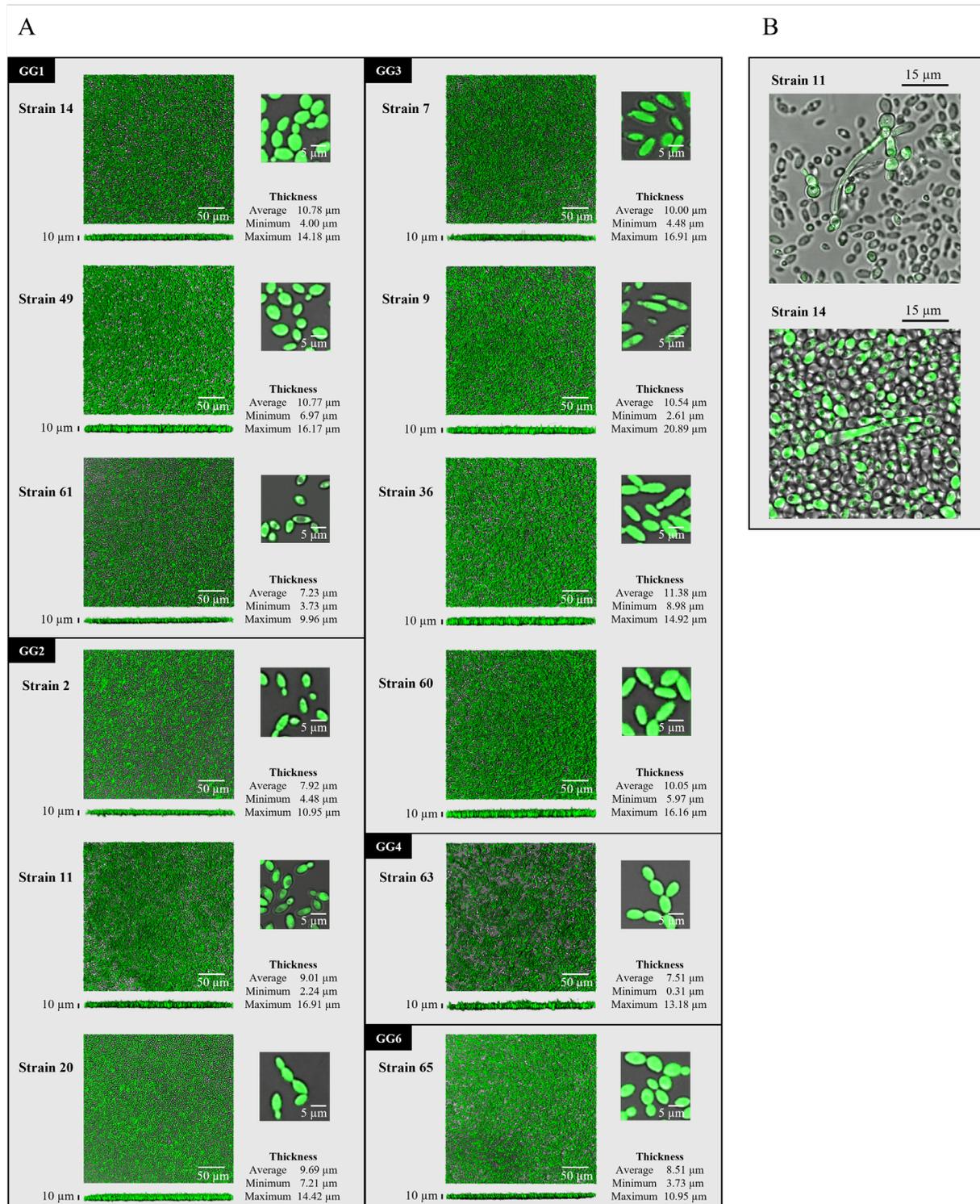


Figure 1.1. CLSM observations of 7 day-aged biofilms formed on polystyrene plates for the 12 selected strains. Cells were fluorescently tagged with cFDA. (A) For each strain (i) three-dimensional reconstruction images of the biofilms generated a top view and side view, (ii) zoomed-in images focus on cells and (iii) the thickness of biofilms. The images are representatives of three independent biological replicates. (B) Filamentous cells in the biofilm formed by strains 11 and 14.

Table 1.3. Average values of cell area and of length to width (l/w) ratio and shape of the cells for the 12 selected strains obtained from CLSM images.

Strain	Average l/w	Average cell area (μm^2)	Shape	
GG1	14	1.53 \pm 0.19	17.10 \pm 2.55	Round
	49	1.56 \pm 0.18	14.34 \pm 2.39	Round
	61	1.91 \pm 0.30	12.75 \pm 2.63	Rice grain
GG2	2	1.89 \pm 0.25	10.77 \pm 2.44	Rice grain
	11	1.92 \pm 0.42	11.26 \pm 3.49	Rice grain
	20	1.93 \pm 0.27	12.06 \pm 2.15	Rice grain
GG3	7	2.35 \pm 0.42	16.13 \pm 2.82	Elongated
	9	2.47 \pm 0.31	17.34 \pm 3.08	Elongated
	36	2.62 \pm 0.46	15.79 \pm 2.75	Elongated
	60	2.70 \pm 0.51	16.74 \pm 3.24	Elongated
GG4	63	2.08 \pm 0.47	16.03 \pm 2.79	Lemon
GG6	65	1.50 \pm 0.20	16.57 \pm 3.32	Round

To better characterize these different cell shapes, the length to width ratio (l/w) and cell area were determined for 50 individual cells per strain (Basmaciyan *et al.*, 2018). Each genetic group was characterized by its own cell measurements and cell shape (**Table 1.3**). The strains of GG1 were characterized by a “round” shape with an average cell area of $15.72 \mu\text{m}^2$ and average l/w ratio of 1.55, except strain 61 which presented a “rice grain” shape with atypical measurements of $12.75 \mu\text{m}^2$ and 1.91, respectively. The strains of GG2 with a “rice grain” shape were characterized by an average cell area of $11.36 \mu\text{m}^2$ and average l/w ratio of 1.91. The strains of GG3 were characterized by an “elongated” shape with an average cell area of $16.5 \mu\text{m}^2$ and an average l/w ratio of 2.53. Strain GG4 was characterized by a “lemon” shape with a cell area of $16.03 \mu\text{m}^2$ and a l/w ratio of 2.08. Finally, the “round” shaped cells of GG6 presented an average cell area of $16.57 \mu\text{m}^2$ and an average l/w ratio of 1.50. The distribution of the 12 strains according to cell area determined as a function of l/w ratio (**Figure 1.2**), showed that the strains were statistically distributed in 3 different areas corresponding to morphological cell characteristics. GG3 and GG4 (area A) were grouped together as were GG6 and GG1 (area B), with the exception of strain 61. Indeed, this strain was statistically grouped with GG2 (area C). These results suggest a link between genetic groups and cell morphology.

Although CLSM provided an overview of the cells adhered on polystyrene, additional SEM observations were necessary to demonstrate and validate characteristic structures of biofilm development. Observations of strains 11 and 14 developed for 7 days on the stainless-steel chips in YPD medium (**Figure 1.3A**) revealed the presence of microcolonies containing cells embedded in EPS and filamentous cells possibly playing a role in their cohesion.

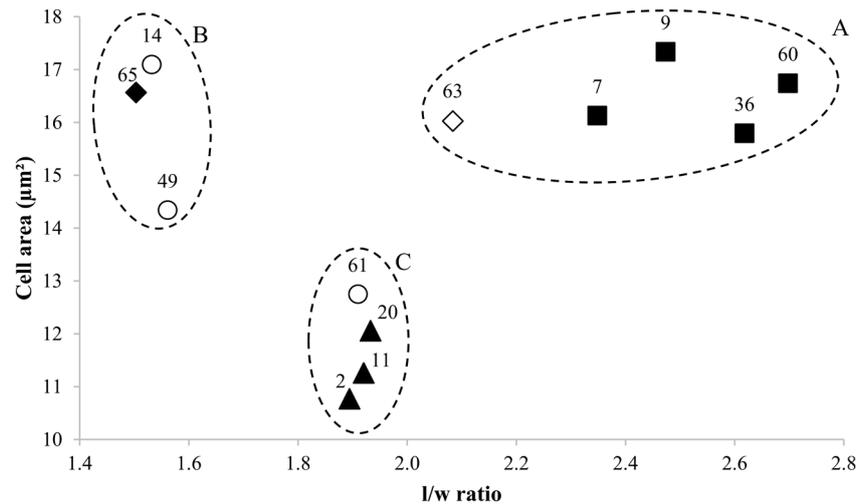


Figure 1.2. Distribution of the 12 strains selected according to length to width (l/w) ratio and cell area measurements (CLSM images). The strains of each genetic group (GG) are represented by an icon: (○) GG1, (▲) GG2, (■) GG3, (◇) GG4 and (◆) GG6. Clustering in 3 areas A, B and C indicated by circles (ANOVA, Tukey HSD, p -values ≤ 0.01).

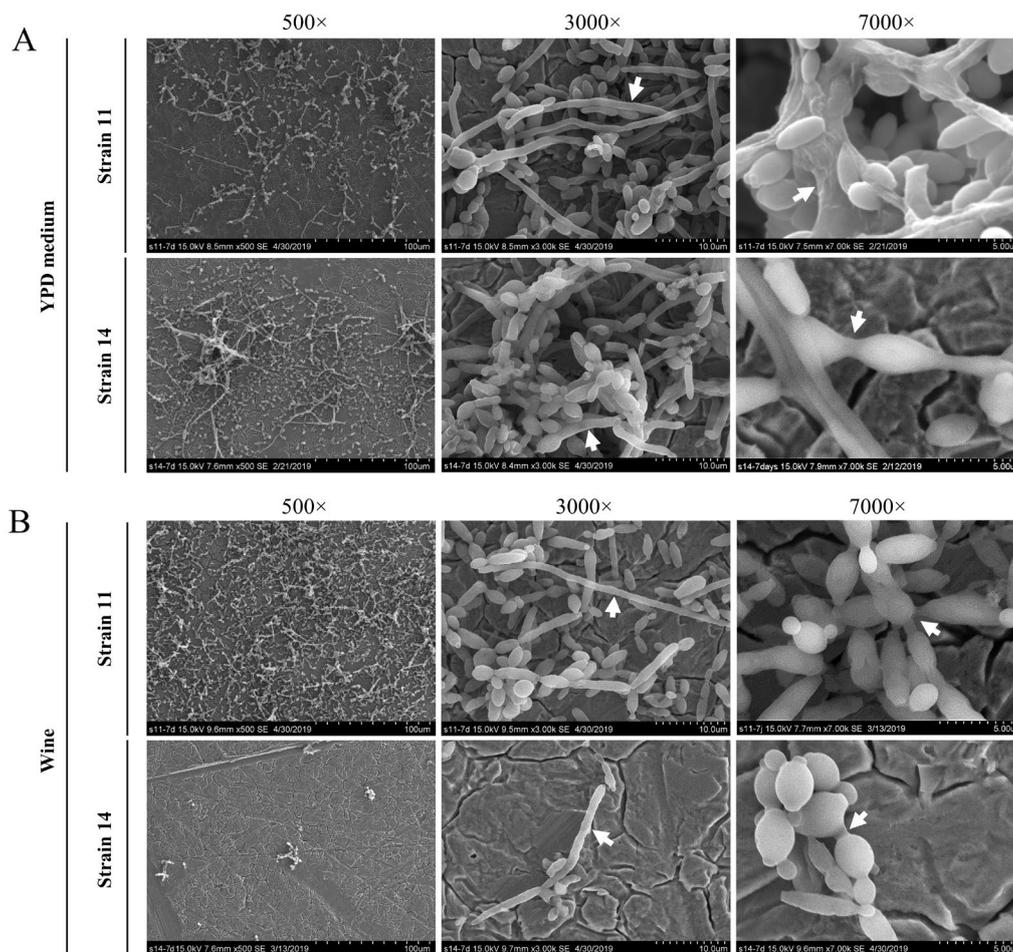


Figure 1.3. SEM observations of 7 day-aged microcolonies of strains 11 and 14 developed on stainless steel chips in (A) YPD medium and (B) in wine. Magnifications were performed (i) at 500 \times : development of the microcolonies on the stainless steel surface, (ii) at 3000 \times : filamentous cells (indicated by white arrows), and (iii) at 7000 \times : microcolonies with EPS (indicated by white arrows). The images are representatives of three independent biological replicates.

3.2. *Brettanomyces* biofilm mode of life: what's up in wine?

The ability of both strains (11 and 14) of *B. bruxellensis* were then investigated in wine to study (i) the development into biofilm in wine and (ii) the impact of wine on an established *B. bruxellensis* biofilm. These strains were chosen for their different ability to adhere on polystyrene (**Table 1.2**).

Firstly, in order to confirm the ability of both strains to form biofilm in wine, SEM observations at 7 days were performed (**Figure 1.3B**). Once again, the capacity of both strains to adhere and form microcolonies surrounded by EPS was demonstrated as well as the presence of filamentous cells, suggesting the beginning of a biofilm structure development. However, strain 14 presented only a few microcolonies scattered on the chips: adhesion and microcolony formation of strain 14 were more affected by the wine than strain 11. The *B. bruxellensis* cell growth on stainless steel chips was monitored in wine from 2 h to 14 days (**Figure 1.4**). Strain 14 had a weak adhesion rate of 0.69% at 2 h compared to strain 11 (5.69%). This difference was maintained between both strains until 7 days. However, after 2 h, for both strains, no growth was observed.

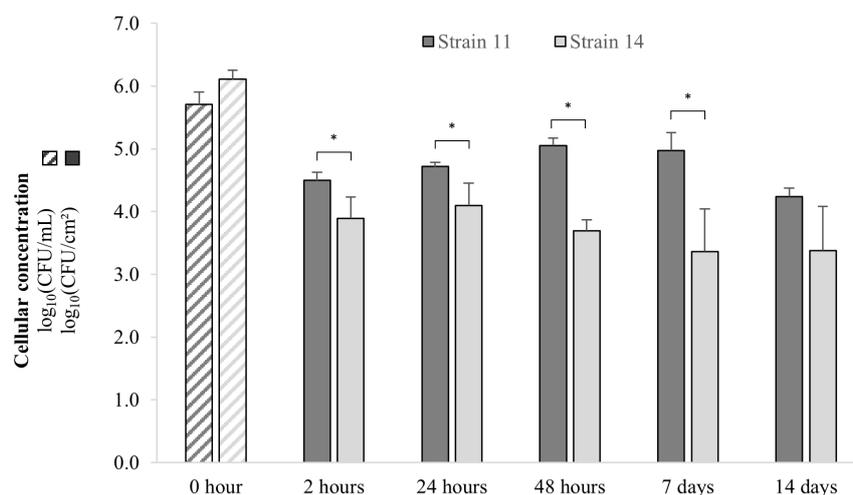


Figure 1.4. Microcolony growth on stainless steel chips in wine for strains 11 and 14 ($\log_{10}(\text{CFU}/\text{cm}^2)$). Planktonic inoculum was expressed in CFU/mL . Errors bars represent the standard deviation between three independent biological replicates. Statistical analysis is performed between both strain at each time (ANOVA, Tukey HSD, p -value ≤ 0.05).

Secondly, the impact of wine on an established *B. bruxellensis* biofilm was investigated. A 7 day-aged biofilm (previously developed on stainless steel chips in YPD medium) was immersed in wine for enumeration of cells (i) on the chips and (ii) released into the wine (**Figure 1.5**). For both strains, the amount of cells adhered on the stainless steel chip significantly decreased at 24 h and then remains stable for up to 14 days (**Figures 1.5A and 1.5B**). As previously described, strain 14 was more affected by the wine than strain 11. Moreover, as early as 2 h, the impact of wine on biofilm led to the release of cells from chip with around 10^6 CFU/mL for both strains (**Figures 1.5C and 1.5D**). For strain 14, a decrease in the number of released cells was observed as early as 24 h before remaining stable up to 7 days. Then, a growth recovery was observed at 14 days. The same behaviour was observed for strain 11 in a lesser extent.

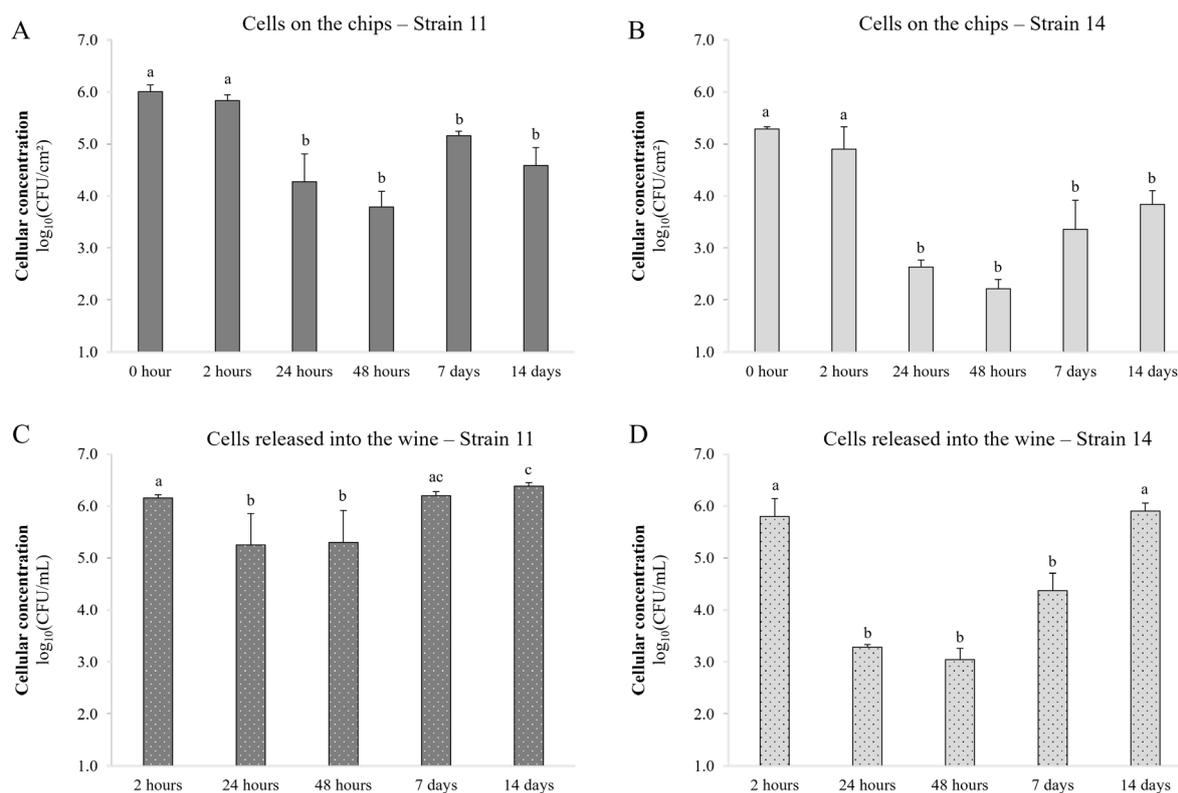


Figure 1.5. Microcolony behavior in wine for (i) cells developed on the chips: (A) strain 11 and (B) strain 14, (ii) cells released from biofilm into the wine: (C) strain 11 and (D) strain 14. Initial populations were 1.1×10^6 CFU/cm² and 2.0×10^5 CFU/cm² respectively for strains 11 and 14. Errors bars represent the standard deviation between three independent replicates. A different letter indicates a significant difference (ANOVA, Tukey HSD, p -value ≤ 0.05).

3.3. Chlamyospore-like element, a new piece of *B. bruxellensis* morphotype

Finally, SEM observations of 14 day-aged microcolonies of strain 11 in wine allowed observing specific round, large and free shaped cells (**Figure 1.6A**). These structures are consistent with the definition of a chlamyospore, a morphological structure defined as larger than a yeast cell, highly refractile cells with thick walls derived from filamentous cells (Staib and Morschhäuser, 2007). Chlamyospore walls are composed by chitin, which can be stained by the calcofluor (Martin *et al.*, 2005). Thus, the use of this staining coupled with epifluorescence microscopy observations allowed to reveal very refractive rounded structures with a thick wall for both strains 11 and 14 grown for 14 days in wine (**Figure 1.6B**).

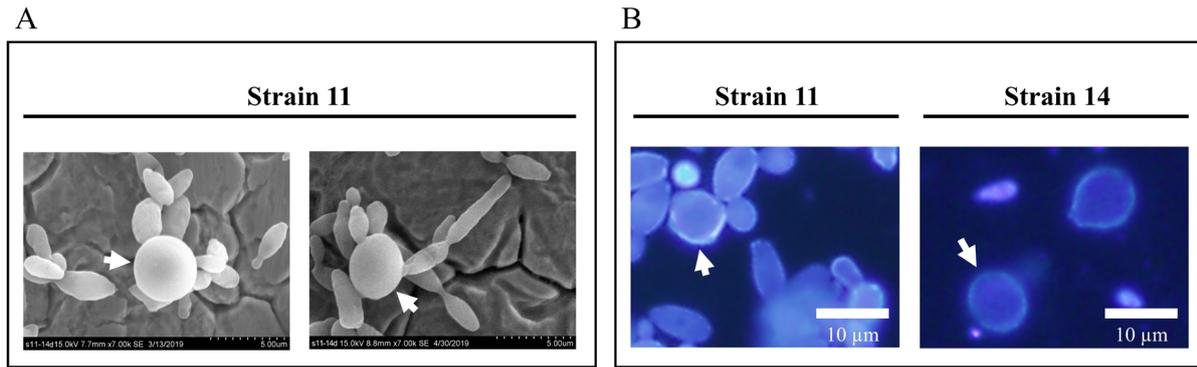


Figure 1.6. Microscopic observations of “chlamyospore-like” produced by *B. bruxellensis* in wine. (A) SEM observations (magnification at 7000×) of 14 day-aged microcolonies developed on stainless steel chips in wine. (B) Epifluorescence microscopy observations after calcofluor staining of adapted planktonic cell cultures of strains 11 and 14 in wine for 14 days. White arrows indicate a “chlamyospore-like”.

4. Discussion

The ability of microorganisms to form biofilm has been pinpointed out (Bastard *et al.*, 2016) as one of the strategies of withstanding wine stresses. Up to now, few studies have highlighted the capacity of *B. bruxellensis* to develop into biofilm-like structure (Ishchuk *et al.*, 2016; Joseph *et al.*, 2007; Kregiel *et al.*, 2018; Poupault, 2015; Tristezza *et al.*, 2010). The analysis methods used staining method associated with OD measurement, luminometry or Calgary Biofilm Device system (MBEC™ P & G assay). The first methods are rapid but quite imprecise. The latter, allowing the enumeration of *B. bruxellensis* biofilm-like structures in CFU/peg, could not be compared with the other methods of biofilm quantification. However, none of these studies described the structure of biofilm formed by *B. bruxellensis* using microscopy, except Poupault (2015). For the present study, a protocol adapted from an established method of numbering bacterial biofilm populations (Bastard *et al.*, 2016) was developed to study the biofilm formation of *B. bruxellensis* yeast on different supports such as polystyrene plates and stainless steel chips. Cells were placed in the same physiological state, allowing to compare the capacity of different strains to form a biofilm (Bastard *et al.*, 2016; Rieu *et al.*, 2014; Stepanović *et al.*, 2007). Moreover, microscopic observations of biofilm structures have been performed to obtain better insight into the biofilm structure of *B. bruxellensis*. Both microscopy methods used highlight different points. CLSM allowed notably to gain information on the shape of the cells and the thickness of the biofilm-like structure while SEM enable to observe easily different cell structures (*i.e.* cells, filaments, chlamyospores) and EPS. The 7 day-aged biofilms formed by the *B. bruxellensis* strains studied in this work had an average thickness of 9.45 µm, which is rather thin compared to biofilms described for other yeast species (Bojsen *et al.*, 2014). However, *Candida albicans* biofilms reach thicknesses ranging from 8 to 84 µm depending on the surrounding environment (Daniels *et al.*, 2013; Nweze *et al.*, 2012). Other yeasts such as *S. cerevisiae* and *Rhodotorula mucilaginosa* presented only microcolonies without any multi-layered architecture (Andersen *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2013).

In this work, CLSM and SEM observations revealed the presence of several filamentous cells that appeared to start from the base of the biofilm and extend upward, suggesting the beginning of a multilayer structure. Similar organizations have been identified in biofilms of *C. albicans* and *C. tropicalis* with a basal layer composed of yeast cells and an upper layer composed of filamentous cells collectively embedded in an extracellular matrix (Daniels *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2017).

Among *B. bruxellensis* morphological features, the specific cell morphology observed in biofilm (based on cell area, length and width measurements) could be related to the genetic group (determined by Avramova *et al.*, 2018a), even if it needs to be confirmed with a larger number of strains.

Since *B. bruxellensis* is the major spoilage yeast of wine, it was crucial to enrich the information available on its capacity to form biofilms in enological environments. So, 2 strains of *B. bruxellensis* with different morphologies and different capacities to form biofilm in YPD medium were selected. Both strains were able to form microcolonies on stainless steel chips in wine even if strain 14 showed lower adhesion and development at 2 weeks than strain 11. Stressful environment of wine had also a strong impact on 7 day-aged microcolonies with cell release in a strain-dependent manner. After a decrease of cell population released in wine, probably due to cell death and/or to the entry in viable but non culturable (VBNC) state (Serpaggi *et al.*, 2012), growth restarted after several days. As described for other microorganisms, the biofilm mode of life may allow *Brettanomyces* to persist in wine and wine-related environments (Bastard *et al.*, 2016). The role of EPS in stress resistance as a function of their nature and proportion in the matrix has been highlighted in several microorganisms (Flemming and Wingender, 2010). By observing EPS in *B. bruxellensis* biofilm, this study provides the basis for new fields of investigation into the resistance of *B. bruxellensis*. No data being available on EPS in *B. bruxellensis* biofilm, it will be necessary to identify the chemical nature of the EPS and then study their specific role in stress resistance mechanisms.

Finally, microscopic observations of planktonic and biofilm cultures in wine unexpectedly revealed the presence of “chlamyospore-like” that have never been observed for *B. bruxellensis*. We observed structures larger than a yeast cell, highly refractile with thick walls and derived from filamentous cells. Such characteristics were reported for the description of chlamyospore-like in *C. albicans* (Martin *et al.*, 2005; Navarathna *et al.*, 2016; Staib and Morschhäuser, 2007), *Cryptococcus neoformans* (Lin and Heitman, 2005) and the close relatives *C. albicans* and *C. dubliniensis* cultured in planktonic or biofilm conditions (Boucherit-Atmani *et al.*, 2011; Citiulo *et al.*, 2009; Staib and Morschhäuser, 2007). Chlamyospores were described as forms of resistance in some fungi like *Duddingtonia flagrans* (Ojeda-Robertos *et al.*, 2009) or *Gibberella zeae* (Son *et al.*, 2012), however in yeast, their role was never clearly identified, although a potential role in the long-term survival of *C. albicans* within the host or in resistance to host immunity was hypothesized (Navarathna *et al.*, 2016; Staib and Morschhäuser, 2007). So, future works should be carried out to determine the role of these “chlamyospore-like” element for *Brettanomyces* yeast.

Acknowledgements: The authors would like to thank the Dimacell Imaging Facility, Agrosup Dijon, INRA, INSERM, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F- 21000 Dijon France and Marie-Laure Léonard and Jean-Marc Dachicourt (ESIREM, Université de Bourgogne, Dijon, France) for their technical assistance for the microscopic observations, and IFV Beauce and Nexidia SAS for providing *B. bruxellensis* strains.

Funding sources: This work was supported by the Regional Council of Bourgogne-Franche-Comté and the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)” [CRB 2016-9201AAO048S01632]; the “Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB)” [CONV1617_04] and the Ministère de l’Enseignement supérieur, de la Recherche et de l’Innovation.

5. References

- Albertin, W., Panfili, A., Miot-Sertier, C., Goulielmakis, A., Delcamp, A., Salin, F., Lonvaud-Funel, A., Curtin, C., Masneuf-Pomarede, I., 2014. Development of microsatellite markers for the rapid and reliable genotyping of *Brettanomyces bruxellensis* at strain level. *Food Microbiol.* 42, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.012>.
- Alexandre, H., 2013. Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*-their ecology, genetics and metabolism. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.021>.
- Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L.M., Briandet, R., Cotter, P.D., 2019. Biofilms in food processing environments: challenges and opportunities. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 10, 173–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121805>.
- Andersen, K.S., Bojsen, R., Sørensen, L.G.R., Nielsen, M.W., Lisby, M., Folkesson, A., Regenber, B., 2014. Genetic basis for *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in liquid medium. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 4, 1671–1680. <https://doi.org/10.1534/g3.114.010892>.
- Avramova, M., Cibrario, A., Peltier, E., Coton, M., Coton, E., Schacherer, J., Spano, G., Capozzi, V., Blaiotta, G., Salin, F., Dols-Lafargue, M., Grbin, P., Curtin, C., Albertin, W., Masneuf-Pomarede, I., 2018a. *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. *Sci. Rep.* 8, 4136. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22580-7>.
- Avramova, M., Vallet-Courbin, A., Maupeu, J., Masneuf-Pomarede, I., Albertin, W., 2018b. Molecular diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis*’ sulfur dioxide sensitivity through genotype specific method. *Front. Microbiol.* 9, 1260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01260>.
- Basmacıyan, L., Berry, L., Gros, J., Azas, N., Casanova, M., 2018. Temporal analysis of the autophagic and apoptotic phenotypes in *Leishmania* parasites. *Microb. Cell* 5, 404–417. <https://doi.org/10.15698/mic2018.09.646>.
- Bastard, A., Coelho, C., Briandet, R., Canette, A., Gougeon, R., Alexandre, H., Guzzo, J., Weidmann, S., 2016. Effect of biofilm formation by *Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and the release of aromatic compounds in wine. *Front. Microbiol.* 7, 613. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00613>.
- Bojsen, R., Regenber, B., Folkesson, A., 2014. *Saccharomyces cerevisiae* biofilm tolerance towards systemic antifungals depends on growth phase. *BMC Microbiol.* 14, 305. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0305-4>.
- Boucherit-Atmani, Z., Seddiki, S.M.L., Boucherit, K., Sari-Belkharoubi, L., Kunkel, D., 2011. *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *J. Mycol. Med.* 21, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2011.07.006>.
- Bridier, A., Sanchez-Vizuet, P., Guilbaud, M., Piard, J.C., Naïtali, M., Briandet, R., 2015. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.* 45, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>.
- Bruvo, R., Michiels, N.K., D’Souza, T.G., Schulenburg, H., 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Mol. Ecol.* 13, 2101–2106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02209.x>.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60, 165–178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>.
- Citiulo, F., Moran, G.P., Coleman, D.C., Sullivan, D.J., 2009. Purification and germination of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* chlamydospores cultured in liquid media. *FEMS Yeast Res.* 9, 1051–1060. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00533.x>.
- Coenye, T., Nelis, H.J., 2010. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 83, 89–105. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.018>.
- Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Henick-kling, T., Bisson, L.F., 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 139–147.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>.
- Daniels, K.J., Park, Y.N., Srikantha, T., Pujol, C., Soll, D.R., 2013. Impact of environmental conditions on the form and function of *Candida albicans* biofilms. *Eukaryot. Cell* 12, 1389–1402. <https://doi.org/10.1128/EC.00127-13>.
- Davey, M.E., O’toole, G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>.
- Flemming, H.-C., 2016. EPS—then and now. *Microorganisms* 4, 41. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4040041>.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.

- Fugelsang, K.C., 1997. Wine microbiology. The Chapman and Hall Enology Library, New York.
- Germec, M., Turhan, I., Demirci, A., Karhan, M., 2016. Effect of media sterilization and enrichment on ethanol production from carob extract in a biofilm reactor. *Energy Sources, Part A Recover. Util. Environ. Eff.* 38, 3268–3272. <https://doi.org/10.1080/15567036.2015.1138004>.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.
- Ishchuk, O.P., Zeljko, T.V., Schifferdecker, A.J., Wisén, S.M., Hagström, Å.K., Rozpedowska, E., Andersen, M.R., Hellborg, L., Ling, Z., Sibirny, A.A., Piškur, J., 2016. Novel centromeric loci of the wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis* *CEN1* and *CEN2*. *PLoS One* 11, e0161741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161741>.
- Jachlewski, S., Jachlewski, W.D., Linne, U., Bräsen, C., Wingender, J., Siebers, B., 2015. Isolation of extracellular polymeric substances from biofilms of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3, 123. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00123>.
- Jones, S.K., Hirakawa, M.P., Bennett, R.J., 2014. Sexual biofilm formation in *Candida tropicalis* opaque cells. *Mol. Microbiol.* 92, 383–398. <https://doi.org/10.1111/mmi.12565>.
- Joseph, C.M.L., Kumar, G., Su, E., Bisson, L.F., 2007. Adhesion and biofilm production by wine isolates of *Brettanomyces bruxellensis*. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 373–378.
- Kamvar, Z.N., Tabima, J.F., Grunwald, N.J., 2014. *Poppr*: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2, e281. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>.
- Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006. The superficial life of microbes. *Nature* 441, 300–302. <https://doi.org/10.1038/441300a>.
- Kregiel, D., James, S.A., Rygala, A., Berłowska, J., Antolak, H., Pawlikowska, E., 2018. Consortia formed by yeasts and acetic acid bacteria *Asaia* spp. in soft drinks. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111, 373–383. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0959-7>.
- Lathey, K.A., Bramley, B.R., Francis, I.L., 2010. Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian cabernet sauvignon and shiraz wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 16, 189–202. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00069.x>.
- Lin, X., Heitman, J., 2005. Chlamyospore formation during hyphal growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 4, 1746–1754. <https://doi.org/10.1128/EC.4.10.1746-1754.2005>.
- Longin, C., Degueurce, C., Julliat, F., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., Alexandre, H., 2016. Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Res. Int.* 89, 620–630. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.019>.
- Martin, S.W., Douglas, L.M., Konopka, J.B., 2005. Cell cycle dynamics and quorum sensing in *Candida albicans* chlamyospores are distinct from budding and Hyphal growth. *Eukaryot. Cell* 4, 1191–1202. <https://doi.org/10.1128/EC.4.7.1191-1202.2005>.
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., Flemming, H.-C., 1999. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* 26, 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00057-4](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00057-4).
- Mørsetrø, T., Langsrud, S., 2017. Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16, 1022–1041. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>.
- Navarathna, D.H.M.L.P., Pathirana, R.U., Lionakis, M.S., Nickerson, K.W., Roberts, D.D., 2016. *Candida albicans* ISW2 regulates chlamyospore suspensor cell formation and virulence *In Vivo* in a mouse model of disseminated candidiasis. *PLoS One* 11, e0164449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164449>.
- Nunes, J.M., Bizerra, F.C., Ferreira, R.C. e, Colombo, A.L., 2013. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 382–389. <https://doi.org/10.1128/AAC.01647-12>.
- Nweze, E.I., Ghannoum, A., Chandra, J., Ghannoum, M.A., Mukherjee, P.K., 2012. Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 149–153. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr429>.
- O'Connell, H.A., Kottkamp, G.S., Eppelbaum, J.L., Stubblefield, B.A., Gilbert, S.E., Gilbert, E.S., 2006. Influences of biofilm structure and antibiotic resistance mechanisms on indirect pathogenicity in a model polymicrobial biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5013–5019. <https://doi.org/10.1128/AEM.02474-05>.
- Oelofse, A., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *South African J. Enol. Vitic.* 29, 128–144. <https://doi.org/10.21548/29-2-1445>.
- Ojeda-Robertos, N.F., Torres-Acosta, J.F.J., Ayala-Burgos, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Valero-Coss, R.O., Mendoza-de-Gives, P., 2009. Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamyospores in ruminants: *in vitro* and *in vivo* studies. *BMC Vet. Res.* 5, 46. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-46>.
- Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K., 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20, 289–290. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>.
- Park, Y., Srikantha, T., Daniels, K.J., Jacob, M.R., Agarwal, A.K., Li, X., Soll, D.R., 2017. Protocol for identifying natural agents that selectively affect adhesion, thickness, architecture, cellular phenotypes, extracellular matrix, and human white blood cell impenetrability of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e01319–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01319-17>.
- Poupault, P., 2015. Caractérisation des phénomènes de bio-adhésion à l'origine des altérations des vins. In: Vigne et vin publications internationales (Ed.), Proceedings of the 10th International Symposium of Enology of Bordeaux. CEno 2015, Bordeaux, France, pp. 234–237.
- Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol. Res.* 162, 154–167. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.02.006>.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-sertier, C., Perello, M.-C., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of

- winemaking. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1208-1219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02959.x>.
- Renouf, V., Miot-sertier, C., Perello, M.-C., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2009. Evidence for differences between *B. bruxellensis* strains originating from an enological environment. *Int. J. Wine Res.* 1, 95-100. <https://doi.org/10.2147/IJWR.S4612>.
- Rieu, A., Weidmann, S., Garmyn, D., Piveteau, P., Guzzo, J., 2007. *agr* system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6125-6133. <https://doi.org/10.1128/AEM.00608-07>.
- Rieu, A., Aoudia, N., Jegou, G., Chluba, J., Yousfi, N., Briandet, R., Deschamps, J., Gasquet, B., Monedero, V., Garrido, C., Guzzo, J., 2014. The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*. *Cell. Microbiol.* 16, 1836-1853. <https://doi.org/10.1111/cmi.12331>.
- Rubio, P., Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Martínez, J., Gutierrez, A.R., 2015. Influence of oak origin and ageing conditions on wine spoilage by *Brettanomyces* yeasts. *Food Control* 54, 176-180. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.034>.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140-1154. <https://doi.org/10.1128/JB.184.4.1140>.
- Schifferdecker, A.J., Dashko, S., Ishchuk, O.P., Piškur, J., 2014. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeast* 31, 323-332. <https://doi.org/10.1002/yea>.
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., 2012. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiol.* 30, 438-447. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.020>.
- Smith, B.D., Divol, B., 2016. *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food Microbiol.* 59, 161-175. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.008>.
- Son, H., Lee, J., Lee, Y.W., 2012. Mannitol induces the conversion of conidia to chlamyospore-like structures that confer enhanced tolerance to heat, drought, and UV in *Gibberella zeae*. *Microbiol. Res.* 167, 608-615. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.04.001>.
- Staib, P., Morschhäuser, J., 2007. Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* - an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 50, 1-12. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01308.x>.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. Di, Djukić, S., Circovic, I., Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. *Apmis* 115, 891-899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chem.* 102, 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.030>.
- Tek, E.L., Sundstrom, J.F., Gardner, J.M., Oliver, S.G., Jiranek, V., 2018. Evaluation of the ability of commercial wine yeasts to form biofilms (mats) and adhere to plastic: implications for the microbiota of the winery environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix188>.
- Timke, M., Wolking, D., Wang-Lieu, N.Q., Altendorf, K., Lipski, A., 2004. Microbial composition of biofilms in a brewery investigated by fatty acid analysis, fluorescence *in situ* hybridisation and isolation techniques. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66,100-107. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1601-y>.
- Timke, M., Wang-Lieu, N.Q., Altendorf, K., Lipski, A., 2008. Identity, beer spoiling and biofilm forming potential of yeasts from beer bottling plant associated biofilms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93, 151-161. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9189-8>.
- Tristezza, M., Lourenço, A., Barata, A., Brito, L., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2010. Susceptibility of wine spoilage yeasts and bacteria in the planktonic state and in biofilms to disinfectants. *Ann. Microbiol.* 60, 549-556. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0085-5>.
- Verstrepen, K.J., Klis, F.M., 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.* 60, 5-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x>.
- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J., 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 1474-1479. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.010>.
- Zarnowski, R., Westler, W.M., Lacmbouh, G.A., Marita, J.M., Bothe, J.R., Bernhardt, J., Sahraoui, A.L.H., Fontainei, J., Sanchez, H., Hatfeld, R.D., Ntambi, J.M., Nett, J.E., Mitchell, A.P., Andes, D.R., 2014. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio* 5, e01333-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01333-14>.

Partie 2. Résultats complémentaires

1. Contexte scientifique

Dans la Partie 1, nous avons montré que *B. bruxellensis* peut adhérer et former des biofilms sur différents supports (polystyrène, acier inoxydable), dans du milieu YPD et du vin. Nous avons également visualisé la structure des biofilms formés sur coupons d'acier par différentes souches et identifié différents types de cellules les constituant. En particulier, des éléments « chlamydospore-like », un type cellulaire encore inconnu chez *B. bruxellensis*, ont été décrits pour la première fois.

Suite au travail proposé dans la Partie 1, nous nous sommes intéressées à l'évolution du biofilm au cours du temps, notamment à son architecture lors d'une maturation plus avancée que 15 jours, et à la production de différents éléments tels que les « chlamydospore-like » dans d'autres conditions qu'en milieu vin. Ensuite, puisque nous avons montré que *B. bruxellensis* pouvait former des biofilms dans différentes conditions, nous avons voulu évaluer l'influence du support sur lequel les levures se développent ainsi que le milieu de culture. Aussi, dans le cadre de la formation de biofilm en vin, nous avons évalué l'impact des cellules en biofilm sur la production de molécules indésirables telles que le 4-éthylphénol.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Souches

Les souches 11 et 14 ont été utilisées à partir de stocks glycérolés conservés à -80°C.

2.2. Formation de biofilm

Dans cette partie 2, la formation de biofilm a été étudiée dans plusieurs conditions (**Figure 1.7**).

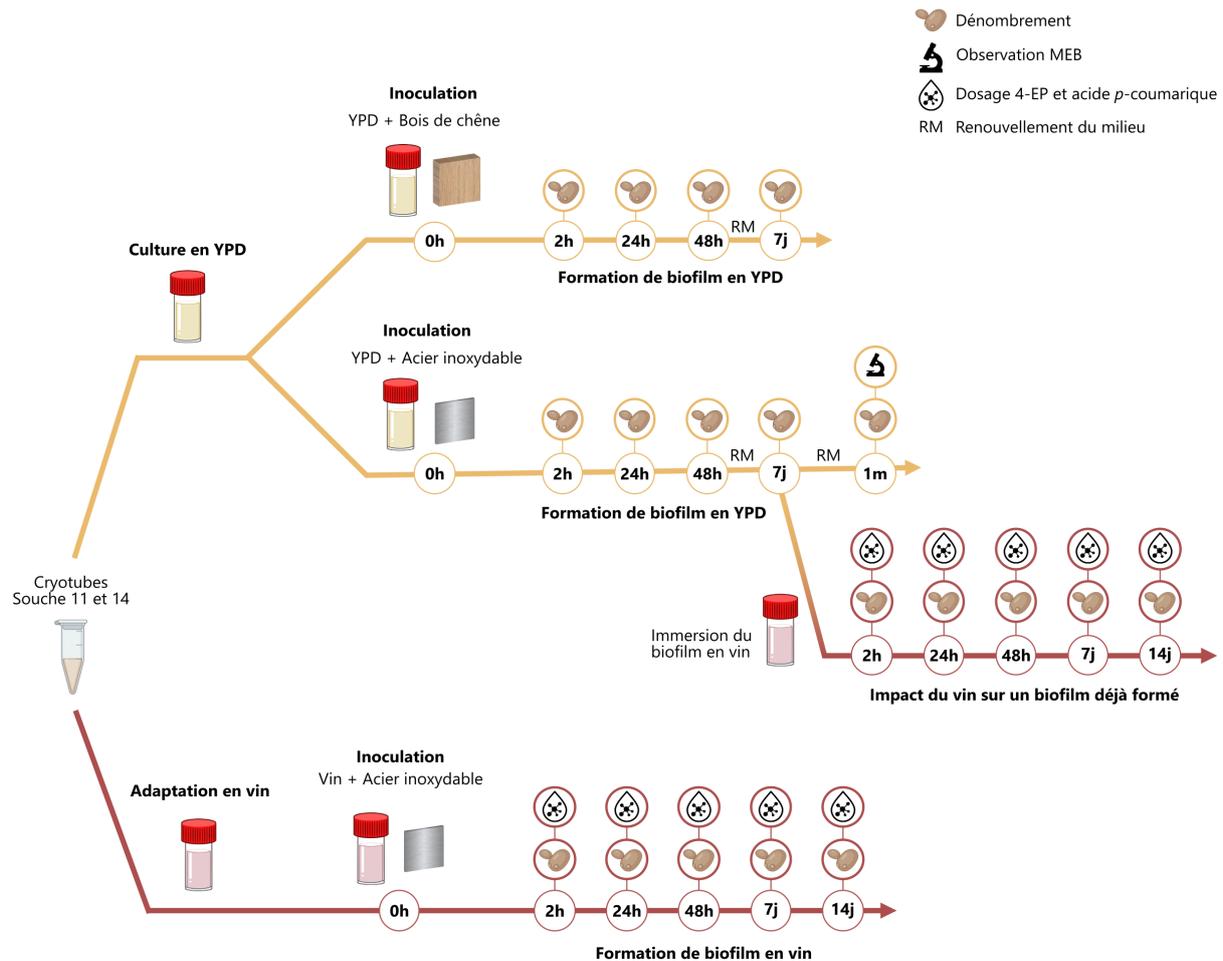


Figure 1.7. Stratégie d'étude de différentes conditions lors de la formation de biofilm chez *B. bruxellensis*.

2.2.1. Formation de biofilm en YPD

Des biofilms ont été formés sur coupon d'acier inoxydable et coupon de bois de chêne (25 mm × 25 mm × 7 mm) dans 13 mL de YPD inoculé avec les souches 11 et 14 selon le protocole décrit Partie 1, paragraphe 2.3. Après 2 heures, 24 heures, 48 heures, 7 jours et 1 mois (avec renouvellement de milieu tous les 3,5 jours), les coupons ont été collectés et la population de cellules adhérentes au support a été dénombrée selon le protocole décrit Partie 1, paragraphe 2.4.3. (**Figure 1.7**).

2.2.2. Formation de biofilm en vin

Les protocoles utilisés pour l'adaptation en vin, la formation de biofilm en vin et l'étude de l'impact du vin sur un biofilm déjà formé sont décrits dans la Partie 1, respectivement en paragraphe 2.4.2., paragraphe 2.4.3. et paragraphe 2.4.4. (**Figure 1.7**).

2.3. Observations microscopiques

2.3.1. Microscopie électronique à balayage

Pour évaluer l'évolution d'un biofilm de *B. bruxellensis* à long terme, un biofilm formé en YPD sur acier inoxydable par la souche 14 après 1 mois d'incubation à 28°C a été observé par microscopie électronique à balayage. La préparation des échantillons et les observations microscopiques ont été réalisées selon le protocole décrit Partie 1, paragraphe 2.5.2.

2.3.2. Microscopie optique à transmission

Pour la recherche de « chlamyospore-like », (i) une culture planctonique en YPD de la souche 11 après 2 semaines d'incubation à 28°C et (ii) des structures macroscopiques développées en surface du milieu lors de la formation de biofilm par la souche 11 après 3 semaines d'incubation à 28°C, ont été observées en microscopie optique à transmission avec le microscope EVOS® FL (Invitrogen, Bothell, WA, USA) aux grossissements $\times 40$ et $\times 100$.

2.3.3. Microscopie à épifluorescence

Pour la recherche de « chlamyospore-like », une colonie de la souche 14 sur gélose YPD après 3 semaines d'incubation à 28°C a été remise en suspension pour une observation au microscope à épifluorescence. La préparation des échantillons et les observations microscopiques ont été réalisées selon le protocole décrit Partie 1, paragraphe 2.5.3.

2.4. Analyse UHPLC des concentrations d'acide *p*-coumarique et de 4-éthylphénol

La consommation d'acide *p*-coumarique et la production de 4-éthylphénol ont été suivies lors de la formation de biofilm en vin et lors de l'étude de l'impact du vin sur un biofilm déjà formé, décrites dans la partie 1. A partir de ces expériences, le dosage de l'acide *p*-coumarique et du 4-éthylphénol dans le vin a été réalisé après adaptation d'une précédente méthode (Longin *et al.*, 2016a). Les échantillons de vin rouge ont été supplémentés avec de l'acide *p*-coumarique (Sigma) pour atteindre une concentration de 6,5 mg/L. Les échantillons ont été centrifugés (9000g, 5 min, 20°C) pour éliminer les cellules et récupérer seulement le surnageant avant de procéder à l'analyse. Le système Acquity UHPLC H-CLASS (Waters, Milford, MA, USA) équipé d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) et d'un détecteur à fluorescence (FLR) a été utilisé pour l'analyse. L'acide *p*-coumarique consommé et le 4-éthylphénol produit ont été détectés et quantifiés au cours du temps, à 310 nm avec le DAD et à $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 305 \text{ nm}$ avec le détecteur FLR, respectivement. Pour cela, 2 μL d'échantillon ont été injectés dans

une colonne Waters Coreshell Raptor ARC-18 (2,7 μm ; 100 \times 3,0 mm; 9314A1E). Le four à colonne et le système d'échantillonnage ont été thermostatés à 30°C et 8°C, respectivement. Le solvant A était composé d'une solution eau-acétonitrile-acide formique 100:1,25:0,5 (v/v) et le solvant B d'une solution acétonitrile-acide formique 100:0,1 (v/v). L'élution a été réalisée d'après un gradient progressif de la manière suivante (pourcentage de solvant B) : de 32 à 35 % (0-1,5 min), de 35 à 100 % (1,5-2 min), 100 % (2-5 min). Cette étape a été suivie d'une période d'équilibrage de 6 min avec les conditions initiales avant l'injection de l'échantillon suivant. Le débit a été réglé à 1,3 mL/min. L'analyse des données et l'intégration des pics ont été effectuées à l'aide du logiciel Waters Empower II. Les concentrations d'acide *p*-coumarique et de 4-éthylphénol ont été calculées par comparaison entre la valeur de l'aire obtenue à partir de l'échantillon et celle d'un standard sélectionné. Cinq concentrations de 0,1 à 10 mg/L d'acide *p*-coumarique et cinq concentrations de 0,1 à 4 mg/L de 4-éthylphénol ont été analysées en triplicata et utilisées pour établir les courbes standards ($r^2 = 0,99$). L'identification de l'acide *p*-coumarique et du 4-éthylphénol observés a été basée sur leurs temps de rétention (0,5 min et 1,8 min respectivement) comparés à ceux des standards testés, ainsi que sur leurs caractéristiques spectrales.

3. Evolution du biofilm et structures « biofilm-like »

3.1. Biofilm mature

Afin d'étudier des biofilms matures, des biofilms âgés de 7 jours à 1 mois ont été produits. Après 1 mois d'incubation en YPD, un développement important de biomasse a été observé sur le coupon (**Figure 1.8**).

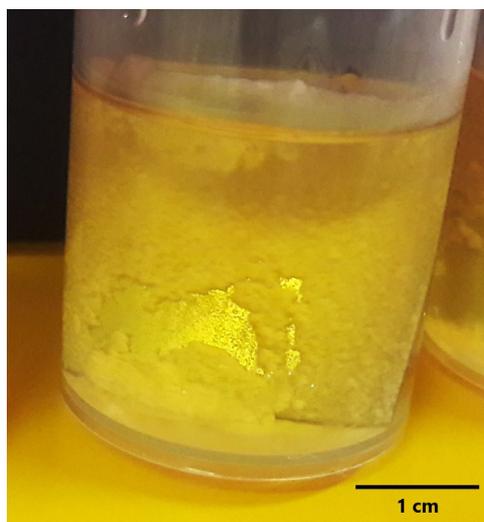


Figure 1.8. Photographie d'un biofilm de *B. bruxellensis* souche 14 développée sur coupon d'acier en YPD après 1 mois d'incubation à 28°C.

Le biofilm semblait compact mais des fragments se sont détachés au cours de l'incubation reflétant une faible adhésion au support ou un détachement naturel, étant une étape du cycle de vie en biofilm. La population adhérente au coupon pouvait atteindre $2,14 \times 10^7$ UFC/mL à 1 mois (Tableau 1.4).

Tableau 1.4. Croissance en biofilm de la souche 14 sur acier inoxydable en YPD.

	7 jours	1 mois
Population adhérente au coupon (UFC/cm²)	$2,40 \times 10^5$	$2,14 \times 10^7$
	$\pm 3,83 \times 10^4$	$\pm 5,56 \times 10^6$

Des observations au microscope électronique à balayage ont été réalisées pour observer la structure et les cellules au sein de ce biofilm mature (Figure 1.9). Les observations ont révélé une colonisation hétérogène de la surface, ainsi que la présence d'un véritable réseau structuré en 3D (Figure 1.9A), composé de cellules levures (Figure 1.9B) et de nombreux filaments parcourant et reliant l'ensemble la structure (Figures 1.9A et 1.9C). Le biofilm observé ici était très semblable à ceux formés par *Candida* spp. (Jones *et al.*, 2014; Mancera *et al.*, 2021). De plus, des petits amas blancs ont été observés à la surface des cellules (Figure 1.9C). De tels amas ont également été mis en évidence chez *Candida* spp. à la surface des cellules en biofilms et ont été décrits comme de la matrice produite par les cellules du biofilm (Al-Fattani and Douglas, 2006; Mitchell *et al.*, 2016b; Nett *et al.*, 2011).

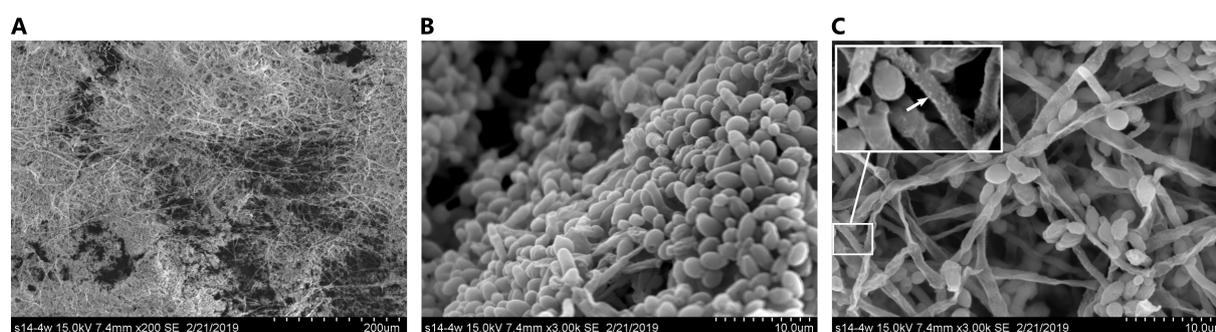


Figure 1.9. Observations au microscope électronique à balayage d'un biofilm de *B. bruxellensis* âgé de 1 mois en YPD. Des images ont été acquises (A) au grossissement $\times 200$ et (B et C) au grossissement $\times 3000$. La flèche indique de la matrice.

3.2. Structures « biofilm-like »

Lors de l'étude de la formation de biofilm, des structures macroscopiques ont été observées en surface du milieu de culture, composées d'un voile et de corps blanchâtres flottant à la surface (Figure 1.10A). Par des observations microscopiques, ces structures se sont révélées être composées de cellules levures et d'un réseau de filaments (Figure 1.10B), rappelant la

structure des biofilms développés sur support acier. Ainsi, ces structures macroscopiques présentent à la surface du milieu pourraient être des biofilms développés à l'interface air-liquide. En effet, *B. bruxellensis* a précédemment été identifiée dans des biofilms développés à l'interface air-liquide tels que les voiles à la surface de vins en vieillissement, (David-Vaizant and Alexandre, 2018) et la mère de kombucha (Coton *et al.*, 2017).

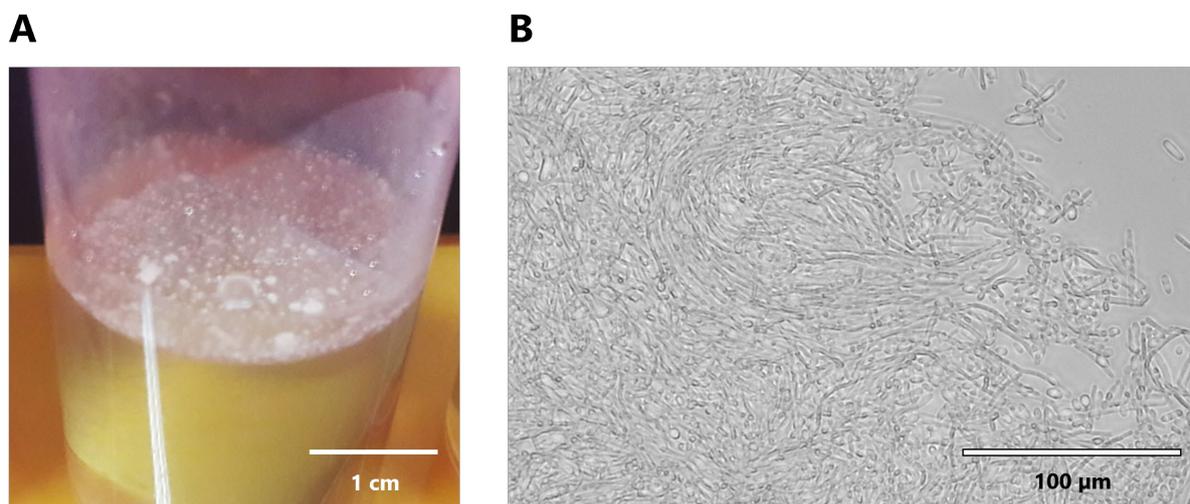


Figure 1.10. (A) Photo et (B) Observation microscopique d'une structure macroscopique développées à l'interface air-liquide.

En observant les nombreux dénombrements réalisés sur YPD gélosé, certaines colonies présentaient une architecture complexe (**Figure 1.11**), différente de la forme classique (ronde, lisse aux bords réguliers). Des colonies atypiques ont précédemment été observées suite à des modifications génétiques d'une souche de *B. bruxellensis* (Ishchuk *et al.*, 2016). En effet, des transformants présentaient plusieurs modifications phénotypiques : une production de biofilm plus élevée, la formation de communautés mats avec une structure plus complexe ainsi que l'apparition de colonies complexes. Les auteurs suggèrent que l'apparition de ces colonies atypiques chez les transformants pourrait être due à un changement dans l'expression des gènes lié à la formation de biofilm. De telles colonies atypiques ont été observées chez *S. cerevisiae* (Granek and Magwene, 2010), qui ont été définies comme des « colonies biofilms » dans la littérature (Nguyen *et al.*, 2018). En revanche, selon la définition établie dans ce projet de thèse, ce type de communautés est plutôt considéré comme « biofilm-like ». Contrairement aux colonies classiques, les colonies complexes possèdent des attributs communs aux biofilms (production importante de matrice, une grande capacité de rétention d'eau, production de l'adhésine Flo11p impliquée dans l'adhésion au support et dans la formation d'une architecture 3D) (Kuthan *et al.*, 2003; Váchová *et al.*, 2011).

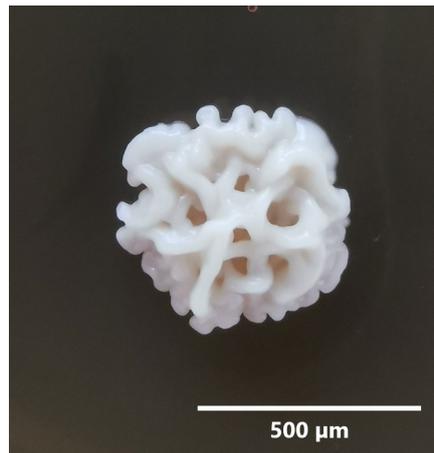


Figure 1.11. Photo d'une colonie complexe de *Brettanomyces bruxellensis* développée sur gélose.

Ainsi, les structures macroscopiques en surface du milieu et les colonies atypiques observées dans ce travail pourraient être considérées comme des « biofilm-like » chez *B. bruxellensis*, dont l'étude pourrait apporter des informations sur le mode de vie biofilm de cette levure.

4. *B. bruxellensis* : levure productrice de « chlamyospore-like »

Dans la Partie 1, des éléments « chlamyospore-like » ont été nouvellement décrits chez *B. bruxellensis*, produits en cultures planctoniques et en biofilm en vin. Ces éléments ont également été recherchés dans d'autres conditions pour essayer de réunir des informations sur leurs conditions de production. Ainsi, des « chlamyospore-like » ont été observées dans des cultures planctoniques en milieu YPD (**Figure 1.12A**), au sein des structures macroscopiques développées à la surface du milieu (**Figure 1.12B**) et dans des colonies sur gélose YPD (**Figure 1.12C**). Au travers de l'ensemble des observations réalisées, il semble que *B. bruxellensis* soit capable de produire des « chlamyospore-like » dans diverses conditions, que ce soit dans différents milieux (vin, YPD) et différents modes de vie (planctonique, biofilm, structure macroscopique à la surface d'un milieu, colonie). Par la suite, des travaux devront être menés pour déterminer le rôle de ces « chlamyospore-like » (potentiel rôle de résistance chez d'autres levures) et leurs conditions de production (Böttcher *et al.*, 2016; Navarathna *et al.*, 2016; Ojeda-Robertos *et al.*, 2009).

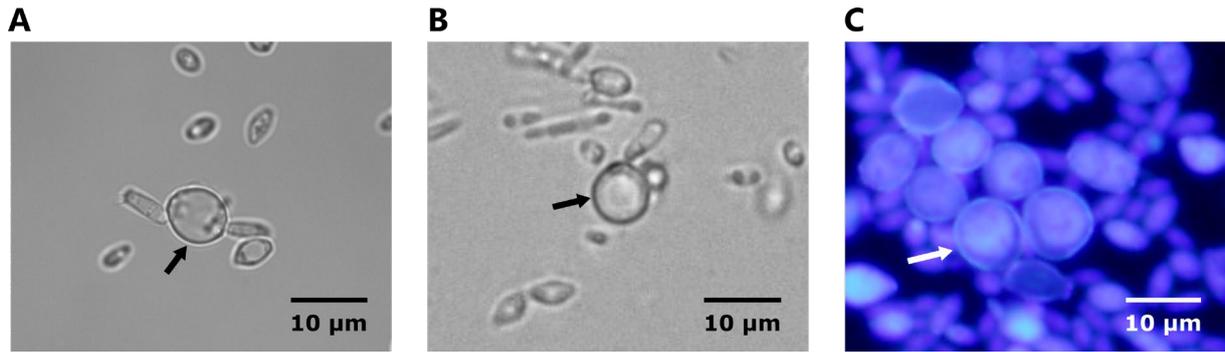


Figure 1.12. Présence de chlamydo-spores-like (A) dans une culture planctonique en milieu YPD, (B) dans une structure macroscopique et (C) dans une colonie développée sur gélose YPD. Les « chlamydo-spore-like » sont indiquées par des flèches.

5. Capacité à former des biofilms selon le support et le milieu

5.1. Formation de biofilm sur différents supports

La capacité de deux souches de *B. bruxellensis* à adhérer sur deux supports fréquemment retrouvés dans l'environnement viti-vinicole, l'acier inoxydable et le bois de chêne, a été évaluée et comparée au cours du temps (**Figure 1.13**).

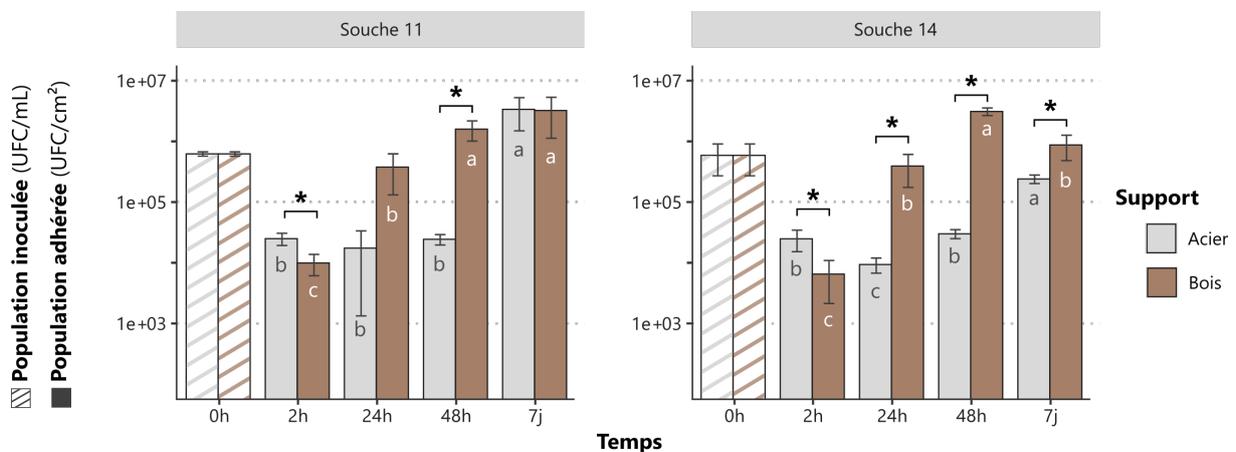


Figure 1.13. Formation de biofilm sur coupons d'acier inoxydable et de bois de chêne en milieu YPD pour les souches 11 et 14 au cours du temps. Les barres hachurées correspondent à la population inoculée en UFC/mL. Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre trois essais biologiques. Le signe * indique une différence significative de population entre les deux supports pour un temps donné (t-test, p -value $\leq 0,05$). Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les temps dans une même série (une souche et un support donnés), (Tests Kruskal-Wallis, Fisher LSD, p -value $\leq 0,05$).

5.1.1. Cinétique de formation de biofilm sur différents supports

Sur acier inoxydable, la population adhérente est restée globalement stable jusqu'à 48 heures. Ensuite, le nombre de cellules adhérentes a augmenté de façon significative après 7 jours. La population finale formée sur le coupon d'acier inoxydable était plus élevée pour la souche 11

que pour la souche 14 (t-test, p -value $\leq 0,05$), suggérant que la capacité à croître en biofilm est souche-dépendante. Sur bois de chêne, la population adhérente au support a augmenté dès 24 heures. Après un maximum atteint à 48 heures, la population en biofilm est restée stable à 7 jours pour la souche 11 alors qu'une diminution a été observée à 7 jours pour la souche 14.

5.1.2. Influence du support sur la population adhérente

En comparant les deux supports à chaque temps, il apparaît que les deux souches présentaient le même comportement à 2 heures : la population de cellules adhérentes était plus élevée sur acier inoxydable que sur bois de chêne. La nature du support semble avoir un impact sur l'adhésion de *B. bruxellensis*. D'après la littérature, l'étape d'adhésion résulte d'interactions physiques et/ou chimiques entre les cellules et la surface. Elle dépend des propriétés physicochimiques du support et des cellules (charge de surface, hydrophobicité, groupes fonctionnels, propriétés donneur et accepteur d'électron, porosité du support) et des conditions environnementales (force ionique, température) (Kang and Choi, 2005; White and Walker, 2011). Chez certaines levures comme *S. cerevisiae* et *Pichia manshurica*, l'hydrophobicité de la surface cellulaire a été fortement corrélée avec la capacité des cellules à adhérer à une surface polystyrène (Monniot *et al.*, 2013; Perpetuini *et al.*, 2018). Une étude menée sur plusieurs souches de *B. bruxellensis* indique majoritairement que les cellules sont chargées négativement avec une surface hydrophile (Dimopoulou *et al.*, 2019). L'étude des propriétés physicochimiques du support et des cellules est une piste à développer pour mieux comprendre le phénomène d'adhésion chez *B. bruxellensis*.

La population développée sur les coupons a été suivie jusqu'à 7 jours. Pour la souche 11, seule la population à 48 heures était significativement plus faible sur acier inoxydable. Quant à la souche 14, une population significativement plus faible a été observée sur coupon d'acier inoxydable comparé au coupon de bois de chêne à chaque temps. Une capacité plus importante à se développer sur un support bois de chêne a été décrite chez un autre micro-organisme du vin, *Oenococcus oeni* dans des conditions de cultures similaires (Bastard *et al.*, 2016). Ces différents résultats confirment le rôle de la nature du support dans le développement de biofilm de *B. bruxellensis*. De plus, le développement de biofilms de *B. bruxellensis* sur un support de bois de chêne pourrait expliquer la persistance de cette levure sur les fûts (Barata *et al.*, 2013).

5.2. Formation de biofilm dans différents milieux

Dans la Partie 1, nous avons montré que *B. bruxellensis* était capable de former des biofilms aussi bien en milieu synthétique qu'en milieu vin après 14 jours. Afin de voir si le milieu

pouvait influencer la capacité à se développer en biofilm, la formation de biofilm a été suivie sur 48 heures et comparée entre le milieu YPD et le vin (**Figure 1.14**).

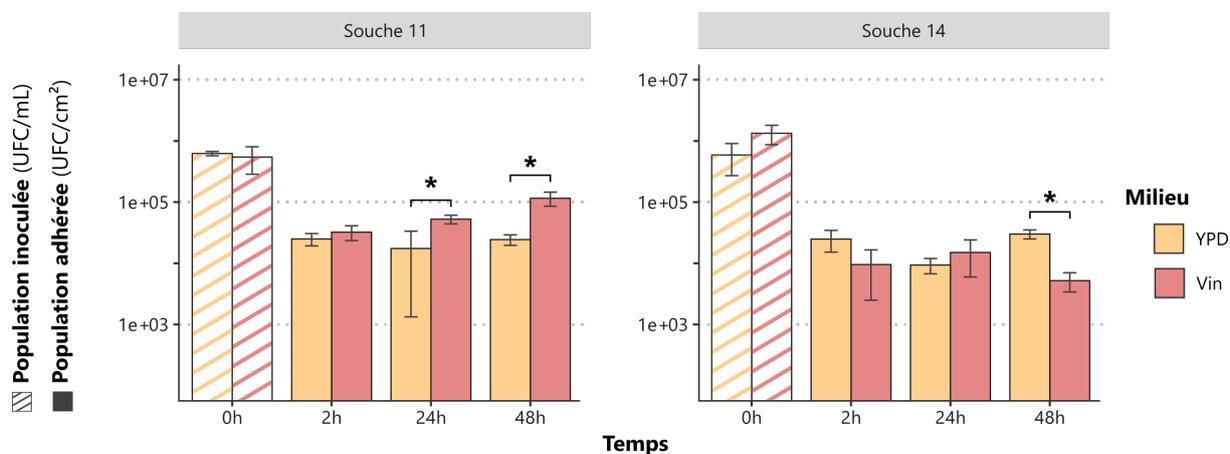


Figure 1.14. Formation de biofilm sur coupon d'acier inoxydable en milieu YPD et vin pour les souches 11 et 14 au cours du temps. Les barres hachurées correspondent à la population inoculée en UFC/mL. Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre trois essais biologiques. Le signe * indique une différence significative de population entre les deux milieux pour un temps donné (t-test, p -value $\leq 0,05$).

Tout comme le support, le milieu semble avoir un impact sur la formation de biofilm chez *B. bruxellensis*, de manière souche-dépendante. En effet, la souche 11 présentait une population adhérente au coupon plus élevée en milieu vin plutôt qu'en YPD, alors que l'inverse a été observé pour la souche 14. Dans une étude précédente, Tristezza *et al.* (2010) ont également observé qu'une souche de *B. bruxellensis* adhérait davantage à un support plastique en vin plutôt qu'en milieu synthétique.

5.3. Production de 4-éthylphénol et biofilm

Dans la partie 1, nous avons mis en évidence que *B. bruxellensis* est capable de former des biofilms en vin sur coupon d'acier inoxydable, ainsi que de persister sous forme de biofilm après immersion en vin. Afin d'évaluer le lien entre la production de 4-éthylphénol et le mode de vie biofilm, la production de ce composé a été étudiée au cours de l'étude portant sur la formation de biofilm en vin (**Figure 1.15A**) et l'étude de l'impact du vin sur un biofilm déjà formé (**Figure 1.15B**) décrite dans la Partie 1.

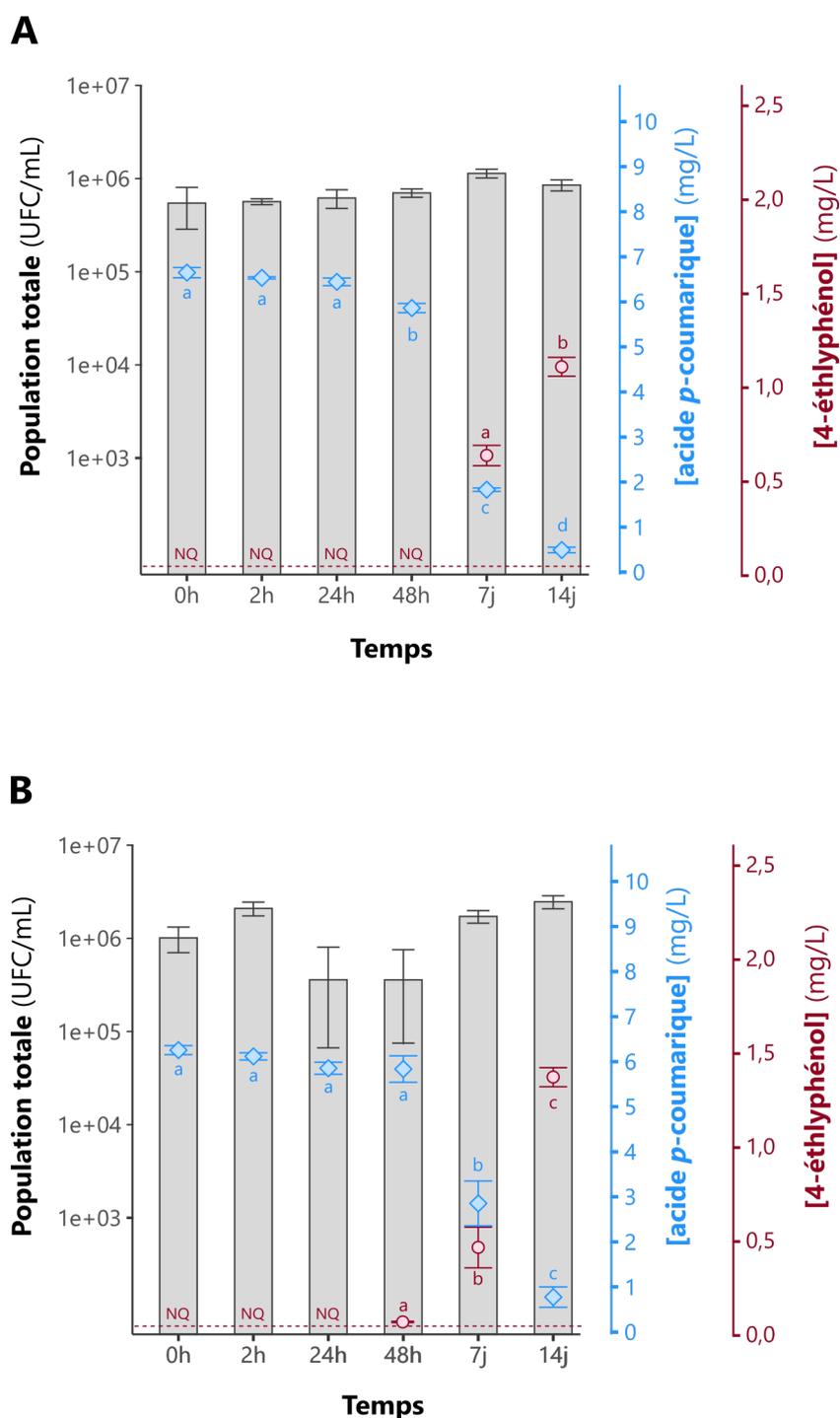


Figure 1.15. Production de 4-éthylphénol (rouge), consommation d'acide *p*-coumarique (bleu) et population totale (gris) lors (A) de la formation de biofilm en vin et (B) lors de l'immersion en vin d'un biofilm déjà formé de la souche 11. Pour le 4-éthylphénol, le seuil de quantification est de 0,05 mg/L (symbolisée par la ligne pointillée rouge) et les valeurs en dessous de la limite de quantification sont indiquées par NQ (non quantifié). Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre trois essais biologiques. Les lettres différences indique des différences significatives dans une même série (ANOVA, Tukey HSD, p -value $\leq 0,05$).

Dans notre étude (avec une concentration initiale d'acide *p*-coumarique de 6,5 mg/L), une production de 4-éthylphénol a été observée lors de la formation de biofilm, atteignant 0,64 mg/L à 7 jours jusqu'à 1,11 mg/L à 14 jours (**Figure 1.15A**). Lors de l'immersion en vin d'un biofilm déjà formé, une faible concentration de 4-éthylphénol a été mesurée à 48 heures (0,07 mg/L) (**Figure 1.15B**). Une concentration de 0,47 mg/L a été observée à 7 jours, atteignant 1,37 mg/L à 14 jours. La concentration de 4-éthylphénol produite associée à la formation de biofilm peut donc dépasser le seuil de perception (0,420 mg/L) voire le seuil de préférence (0,620 mg/L) (Chatonnet *et al.*, 1992). Le dépassement de ces seuils, et donc un potentiel défaut du vin, semble concorder avec un niveau de population de 10^6 UFC/mL. Des résultats similaires ont été obtenus avec la souche 11 et sont en accord avec ceux obtenus par Longin *et al.* (2016) pour des cellules planctoniques en vin. Ainsi, il semblerait qu'une population de 10^6 UFC/mL puisse être un seuil critique dans l'altération du vin en cas de contamination à *B. bruxellensis*. Au cours de notre étude, la production de 4-éthylphénol peut être attribuée à différents états physiologiques comme des cellules planctoniques, des cellules en biofilm ou des cellules libérées du biofilm. Des travaux complémentaires pourront être menés mieux comprendre le lien entre mode de vie biofilm et la production de 4-éthylphénol.

Conclusion du chapitre 1

Les travaux menés dans ce premier chapitre apportent de nouvelles connaissances sur la formation de biofilm chez *B. bruxellensis*. Cette levure est capable de former des biofilms visibles macroscopiquement. Par des observations microscopiques, nous avons pu visualiser le biofilm développé à la surface d'un support, qui est composé de cellules englobées dans une matrice, élément essentiel d'un biofilm. Différents types cellulaires se trouvent impliqués dans la structure du biofilm, comprenant des cellules dont la morphologie semble être souche-dépendante et des filaments assurant un rôle structurant. Des éléments « chlamydospore-like » jusque-là jamais décrits chez l'espèce *B. bruxellensis*, ont été observés au sein du biofilm mais également dans des cultures planctoniques.

De plus, *B. bruxellensis* est capable d'adhérer et former des biofilms sur différents supports (polystyrène, acier inoxydable, bois de chêne) et dans différents milieux (YPD, vin). Il est important de noter que le développement en biofilm de *B. bruxellensis*, en particulier la quantité de cellules adhérees au support, est dépendant de l'environnement (nature du support et type de milieu). Par ailleurs, lorsqu'un biofilm est mis en contact avec du vin, des cellules sont libérées du biofilm et peuvent se développer dans le vin. Ajoutés à la production de 4-éthylphénol pour les cellules en biofilm et/ou relarguées, ces résultats montrent que le biofilm peut être une source de contamination du vin.

Enfin, au travers des différentes expériences menées dans cette étude, les résultats obtenus suggèrent que *B. bruxellensis* serait capable de former également des biofilms à l'interface air-liquide, connus pour être impliqués dans l'élaboration de produits fermentés. De plus, des colonies complexes ont été observées, dont l'architecture rappelle celle de colonies formées par d'autres espèces et considérées comme des communautés « biofilm-like ».

Une partie de ces résultats ont fait l'objet de trois articles de vulgarisation scientifique et de deux communications affichées dans des congrès internationaux (voir « Liste des publications »).

Chapitre 2

Impact des conditions
nutritionnelles sur les capacités
d'invasion et d'adhésion de
Brettanomyces bruxellensis

Contexte scientifique

Dans le premier chapitre, des taux différents de populations adhérees sur coupons ont été observés entre le milieu YPD et le vin. D'après la littérature, l'ensemble des étapes de la formation d'un biofilm est influencé par l'environnement. En particulier, la disponibilité en sources nutritionnelles peut aussi bien conditionner les capacités des cellules au sein du biofilm (adhésion, détachement, activité métabolique) que l'organisation générale du biofilm (architecture, biomasse) (Allan *et al.*, 2002; Reynolds and Fink, 2001; Stoodley *et al.*, 1998; Uppuluri *et al.*, 2010a). Ainsi, dans le but de mieux comprendre le mode de vie biofilm chez *Brettanomyces bruxellensis*, il apparaît essentiel d'étudier les conditions nutritionnelles favorables ou non à la formation de biofilm.

Chez différentes espèces de levure, la formation de biofilm partage des caractéristiques communes avec plusieurs phénotypes, dont l'invasion de gélose. L'étude de ce phénotype a l'avantage de permettre une analyse plus simple et plus rapide. Ainsi, afin d'étudier un grand nombre de modalités rapidement, nous nous sommes donc orientées dans ce deuxième chapitre vers l'étude de l'invasion de gélose chez *B. bruxellensis*, encore jamais décrite chez cette espèce. L'invasion de gélose chez *B. bruxellensis* a tout d'abord été caractérisée à travers des observations macroscopiques et microscopiques en suivant un pipeline d'acquisition et de traitement d'images permettant l'optimisation de l'analyse. L'impact de différences conditions nutritionnelles (comprenant différentes sources de carbone et d'azote) sur la capacité d'invasion de *B. bruxellensis* a été évaluée. Ce criblage a permis de sélectionner des conditions pouvant potentiellement favoriser l'adhésion et/ou la formation de biofilm, compte tenu des similitudes entre ces deux phénotypes chez d'autres espèces. L'impact de ces conditions sur la capacité d'adhésion de *B. bruxellensis* a donc ensuite été étudié.

Les résultats de ce chapitre sont présentés en deux parties. La partie 1 regroupe la caractérisation de l'invasion et l'étude de l'impact des sources de carbone (sous forme d'un article scientifique à soumettre) et la partie 2 comporte l'étude de l'impact des sources d'azote (résultats complémentaires).

Partie 1. Impact de différentes sources de carbone sur les capacités d'invasion et d'adhésion de *Brettanomyces bruxellensis*

Article scientifique à soumettre

Auteurs

Manon Lebleux^{1*}, Emmanuel Denimal², Hervé Alexandre¹, Stéphanie Weidmann¹, Sandrine Rousseaux¹

¹ Laboratoire VALMiS-IUVV, AgroSup Dijon, UMR PAM A 02.102, Université Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

² AgroSup Dijon, Direction Scientifique, Appui à la Recherche, 26 Boulevard Docteur Petitjean, F-21000 Dijon, France

* Correspondance : lebleuxmanon@gmail.com

Mots clés

Brettanomyces bruxellensis, invasion, nutriments, gélose, adhésion, filament

1. Introduction

Le biofilm est un mode de vie très répandu chez les micro-organismes (Flemming *et al.*, 2021; Flemming and Wuerztz, 2019; Kolter and Greenberg, 2006). Il leur confère de nombreux avantages, notamment une protection physique et une résistance accrue aux facteurs biotiques et abiotiques (Carpentier and Cerf, 1993; Flemming, 2016; Mitchell *et al.*, 2016b). Par conséquent, ce mode de vie devient problématique lorsqu'il implique des micro-organismes pathogènes ou d'altération.

Afin d'être en mesure de contrôler ou d'éliminer les biofilms, beaucoup d'études se sont intéressées aux conditions d'établissement de ce mode de vie (Bowden and Li, 1997; Giaouris and Nychas, 2006; Goller and Romeo, 2008; Soll and Daniels, 2016). Il a été montré que la présence ou l'absence de certains nutriments dans le milieu pouvait impacter l'organisation générale du biofilm comme son architecture, sa biomasse ou les espèces présentes (Allan *et al.*, 2002; Stoodley *et al.*, 1998). Chez les levures, les sources de carbone jouent un rôle important dans la formation de biofilm. Par exemple, dans un biofilm formé par *Candida albicans*, la quantité de cellules ainsi que leur activité métabolique sont dépendantes de la source de glucides présente et notamment plus élevées en présence de glucose (Santana *et al.*, 2013). De plus, la disponibilité en glucose influence la capacité d'adhésion des cellules levuriennes, étape qui semble favorisée par une faible disponibilité en glucose chez l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (Reynolds and Fink, 2001). Ensuite, il a été décrit que la dispersion de cellules à partir d'un biofilm de *C. albicans* était fortement dépendante de la nature de la source de carbone présente et que des concentrations croissantes en glucose augmentaient la dispersion des cellules (Uppuluri *et al.*, 2010a).

Les carences en nutriments sont également décrites pour être des facteurs déclencheurs de divers phénotypes tels que la formation de mats et la croissance filamenteuse chez *Candida* spp., *Pichia* spp. et l'espèce *S. cerevisiae* (Csank and Haynes, 2000; Cullen and Sprague, 2012; Dickinson, 2008; Reynolds *et al.*, 2008; van Rijswijk *et al.*, 2014). Ce dernier phénotype est étroitement lié à la capacité d'invasion, notamment du tissu épithélial humain chez *C. albicans* (Desai, 2018) et de gélose chez *S. cerevisiae* (Dickinson, 2008). La capacité d'invasion (aussi appelée invasion, croissance invasive, capacité d'invasion de gélose, capacité de pénétration de l'agar) est étudiée à travers la capacité des cellules à pénétrer dans un milieu gélosé et à s'y développer. L'invasion est aussi dépendante des nutriments disponibles dans le milieu, les facteurs déclencheurs étant principalement des carences nutritionnelles (Cullen and Sprague,

2012; Gagiano *et al.*, 2002; Roberts and Fink, 1994).

Des programmes génétiques communs sont impliqués dans l'expression de plusieurs phénotypes chez *S. cerevisiae* décrits plus haut tels que la capacité à adhérer, à former des mats et à réaliser une croissance invasive (Andersen *et al.*, 2014). Certains gènes tels que *AVT1*, *FLO8*, *MIT1*, *MSS11*, *NPR1*, *RIM8*, *RGT1*, *TEC1*, impliqués par exemple dans diverses voies de signalisation (voie AMPc/PKA, voies des MAPK ...) ou dans le transport de nutriments, sont également impliqués dans la régulation d'un même gène, nommé *FLO11*. Ce dernier code pour une adhésine largement décrite pour son implication à la fois dans la capacité d'adhésion des cellules, la formation de biofilm, la filamentation et la formation de floccs (Bester *et al.*, 2012; Govender *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2000; Ishigami *et al.*, 2004; Kuchin *et al.*, 2002; Reynolds and Fink, 2001; Zara *et al.*, 2005). Ainsi, les phénotypes d'invasion et d'adhésion (étape clé de la formation de biofilm) sont liés par plusieurs caractéristiques communes. L'adhésion pourrait donc être étudiée sous un autre angle à travers l'étude de l'invasion, phénotype permettant d'obtenir rapidement des résultats sur un grand nombre de souches (Cullen, 2015; Naseem *et al.*, 2020).

Dans le but de mieux prévenir et gérer les populations de la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis* sous forme de biofilm (Joseph *et al.*, 2007; Lebleux *et al.*, 2020), il semble nécessaire de déterminer les facteurs déclencheurs de l'adhésion lors de la formation de biofilm, et les conditions (favorables ou défavorables) permettant la mise en place et le maintien de ce mode de vie. Certains de ces facteurs semblent d'ordre nutritionnel (Kregiel *et al.*, 2018; Tristezza *et al.*, 2010). Dans un premier temps, un criblage permettant de caractériser la capacité d'invasion de *B. bruxellensis*, encore jamais décrite chez cette espèce, a été réalisé chez seize souches dans plusieurs conditions nutritionnelles variant en sources de carbone. Afin d'optimiser la standardisation, l'automatisation et la reproductibilité de l'analyse de l'invasion, un pipeline d'acquisition et de traitement d'images a été mis en place. Suite à ce criblage, certaines conditions nutritionnelles ont été sélectionnées et leur impact sur la capacité d'adhésion de quatre souches de *B. bruxellensis* a été étudié.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Souches

Dans cette étude, seize souches de levure *B. bruxellensis* ont été utilisées appartenant à quatre groupes génétiques (GG) différents : GG1 (souches 14, 49, 61, LO2E2), GG2 (souches

2, 11, 17, 20), GG3 (7, 9, 32, 60) et GG4 (souches 63, AWRI1499, CDR219, LO417) (Avramova *et al.*, 2018a; Lebleux *et al.*, 2020). Les souches ont été stockées à -80°C en milieu YPD liquide (0,5% m/v extrait de levure (Biokar, Beauvais, France), 1% m/v bacto-peptone (Biokar), 2% m/v D-glucose (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) et 0,02% m/v chloramphénicol (Sigma, St Louis, USA)), contenant 20% v/v glycérol (Chemlab, Zedelgem, Belgique).

2.2. Milieux

2.2.1. Composition des milieux

La capacité d'invasion de *B. bruxellensis* a été testée sur différents milieux (**Tableau 2.1**), variables en sources de carbone selon leur nature et leur concentration (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000; Carstens *et al.*, 1998; Gimeno *et al.*, 1992).

Tableau 2.1. Composition des milieux gélosés utilisés pour évaluer la capacité de croissance en surface et la capacité d'invasion de *Brettanomyces bruxellensis*. + = présence, - = absence, * : concentration des acides aminés en Tableau 2.2. T+ : milieu complet ; GL : glucose limité ; EO : éthanol optimal ; EL : éthanol limité ; CØ : sans glucose ni éthanol.

Milieu	Agar 2%	YNB 0,17%, NaHCO ₃ 20g/L, Uracile, Adénine 20 mg/L	Sulfate d'ammonium 15 mM	Mix d'acides aminés*	D-glucose	Ethanol
Milieu complet	T+	+	+	+	2%	-
Milieux avec différentes sources de carbone	GL	+	+	+	0,1%	-
	EO	+	+	+	-	2%
	EL	+	+	+	-	0,1%
	CØ	+	+	+	-	-

Les milieux ont été utilisés sous forme solide avec 2% m/v agar bactériologique (VWR, Leuven, Belgique) pour les tests de croissance invasive et sous forme liquide pour les tests d'adhésion. Le milieu de base contenait 0,17% m/v YNB sans acide aminé et sans sulfate d'ammonium (Sigma), 20 mg/L uracile et adénine, 20 g/L NaHCO₃ (Chemlab), 15 mM de sulfate d'ammonium (Honeywell, Seelze, Allemagne) et un mix d'acides aminés (Sigma) (**Tableau 2.2**). Ce milieu de base a ensuite été supplémenté avec différentes sources de carbone (0,1% m/v ou 2% m/v glucose (Sigma) et 0,1% v/v ou 2% v/v éthanol (Charbonneaux-Brabant, Reims, France)).

Tableau 2.2. Composition du mix d'acides aminés et concentration finale dans les milieux testés.

Acide aminé	Concentration finale dans le milieu (mg/L)
L-Acide aspartique	22,25
L-Acide glutamique	60,21
L-Alanine	72,65
L-Arginine	187,19
L-Asparagine	35,02
L-Cystéine	6,55
L-Glutamine	252,64
Glycine	9,16
L-Histidine	16,36
L-Isoleucine	16,36
L-Leucine	24,22
L-Lysine	8,51
L-Méthionine	15,71
L-Phénylalanine	18,98
L-Proline	306,31
L-Sérine	39,27
L-Thréonine	37,96
L-Tryptophane	89,67
L-Tyrosine	9,16
L-Valine	22,25

2.2.2. Préparation des milieux

Pour les tests de croissance invasive, deux solutions ont été préparées séparément pour chaque milieu. La première solution était une solution d'agar (concentration 2×) autoclavée. La deuxième solution contenant le reste des composés (concentration 2×) a été stérilisée par filtration par Steritop® membrane 0,22µm (Merck, Darmstadt, Allemagne). Une fois stériles, les deux solutions ont été placées au bain marie à 65°C avant d'être regroupées. Les milieux gélosés ainsi formés ont été coulés dans des plaques de culture 12 puits (Greiner, Krickenhäuser, Germany) à raison de 4 mL par puit à l'aide d'une Multipette® E3 (Eppendorf, Allemagne) combinée à une seringue Combitips 50 mL (Eppendorf). Une fois les milieux gélosés pris en masse, les plaques de culture ont été mises à sécher stérilement pendant 15 min.

Pour les tests d'adhésion, chaque milieu liquide a été préparé (concentration 1×) puis stérilisé par filtration par Steritop® membrane 0,22µm. Les milieux stériles sont conservés maximum 7 jours à 20°C.

2.3. Croissance en surface et invasion de la gélose

2.3.1. Culture

Le protocole utilisé dans cette étude a été adapté de Carstens *et al.* (1998) et Cullen (2015). A partir des stocks glycérolés à -80°C, chaque souche a été isolée sur YPD gélosé. Une colonie isolée a ensuite été inoculée dans 5 mL de YPD liquide. Les cultures ont ensuite été incubées à

28°C. Une fois la phase stationnaire atteinte, les cellules ont été lavées avec de l'eau stérile après centrifugation (5000g – 5min – 20°C) puis la concentration des cultures a été ajustée à $DO_{600nm} = 10$ (1 $DO_{600nm} = 1,0 \times 10^7$ UFC/mL) dans 1 mL d'eau stérile. A partir de ces cultures, une goutte de 10 μ L a été déposée par puit contenant un milieu gélosé. Pour chaque condition testée (combinaison souche/milieu), 3 essais biologiques ont été réalisés.

Les plaques de culture contenant les milieux gélosés inoculés ont été incubées 7 jours à 28°C en aérobiose dans une étuve avec une réserve d'eau à proximité pour limiter l'assèchement des géloses ; ou en anaérobiose en jarre (système conteneurs BD GasPak™ EZ) contenant des sachets générateurs de condition anaérobie (BD GasPak™ EZ).

2.3.2. Observations macroscopiques de la croissance en surface et de l'invasion de la gélose

Après incubation, les plaques de culture ont été photographiées pour évaluer la croissance en surface de la gélose. Ensuite, les géloses ont été lavées avec de l'eau stérile et frottées délicatement avec le doigt pour éliminer les cultures présentes en surface de la gélose. Une fois sèches, les plaques de culture ont été de nouveau photographiées pour évaluer l'invasion de la gélose. De plus, pour visualiser ou mesurer la profondeur d'invasion, des coupes longitudinales ont été réalisées, placées entre lame et lamelle et photographiées (**Figure 2.1**).

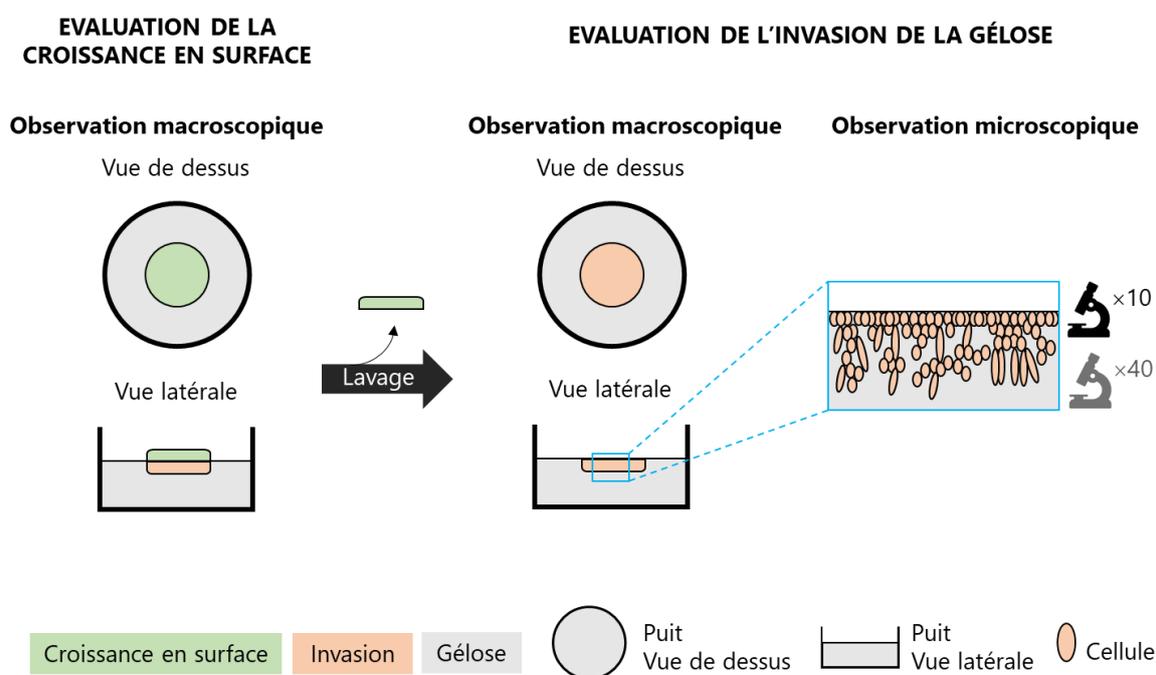


Figure 2.1. Protocole d'évaluation de la croissance en surface de la gélose (avant lavage) et de la capacité d'invasion de la gélose (après lavage).

L'acquisition des photos a été standardisée pour permettre la comparaison des cultures (**Figure 2.2**). Les plaques de culture ont été placées sur un fond noir sous éclairage constant avec système de diffusion homogène de la lumière. L'acquisition des photos a été réalisée avec un appareil photo (Cyber-shot DSC-RX100, Sony, Tokyo, Japon) fixé sur un trépied, avec un paramétrage fixe (sensibilité ISO 80, temps d'exposition : 1,3 secondes, focale F/9). Des photos avec les caractéristiques suivantes ont été obtenues : taille 5472×3648 pixels, couleur, 24 bits, format .JPG.

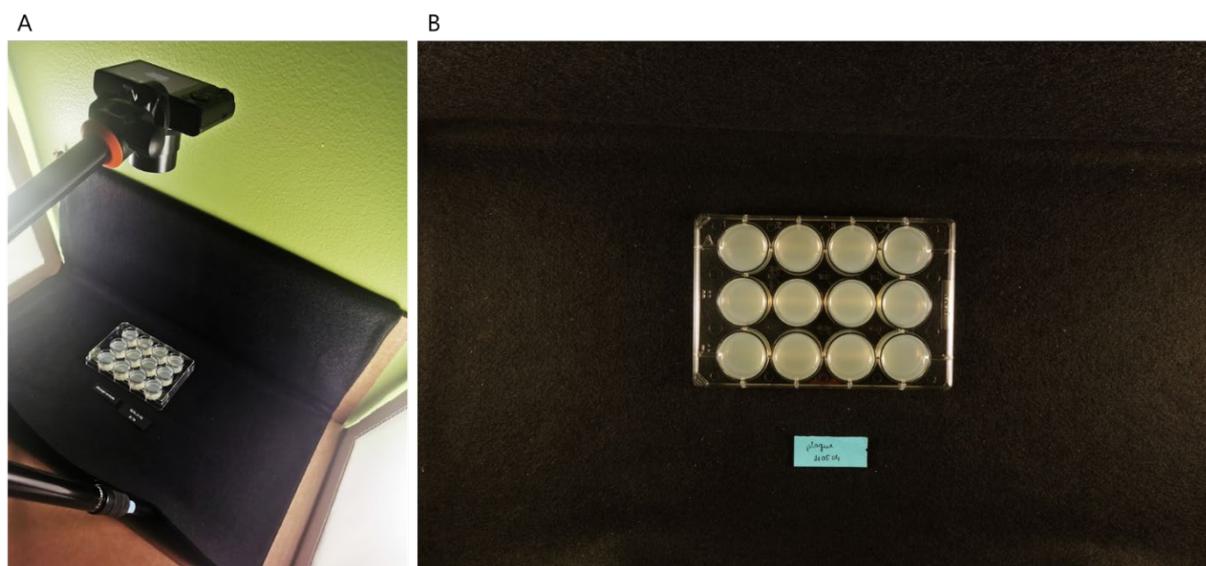


Figure 2.2. (A) Système d'acquisition de photos. (B) Exemple de photo d'une plaque de culture contenant des milieux gélosés.

2.3.3. Observations microscopiques de l'invasion de la gélose

Les échantillons de coupes longitudinales entre lame et lamelle ont été observés au microscope. Tout d'abord, le microscope B-383Pli (Optika, Ponteranica, Italie) avec la caméra TB-3W (Optika) ont été utilisés au grossissement $\times 10$ pour obtenir un agrandissement de la zone envahie. Ensuite, les échantillons ont été observés avec le microscope EVOS® FL (Invitrogen, Bothell, WA, USA) au grossissement $\times 40$ pour observer la morphologie des cellules et les structures cellulaires présentes dans la gélose (**Figure 2.1**).

2.3.4. Analyse des images

2.3.4.1. Analyse visuelle de la croissance et de l'invasion

Afin d'évaluer la capacité des souches de *B. bruxellensis* à se développer en surface de la gélose (étape nommée « croissance ») et à l'envahir (étape nommée « invasion ») selon le milieu étudié, une classification visuelle a été établie pour chaque étape (croissance et invasion)

à partir de l'observation de l'ensemble des cultures (Carstens *et al.*, 1998; Casalone *et al.*, 2005). Ces classifications visuelles se basent sur la comparaison de la densité des cultures en surface de la gélose (pour la croissance) et à l'intérieur de la gélose (pour l'invasion).

Pour la croissance, 612 puits ont été observés et une échelle d'intensité définie en 4 classes a été établie (**Figure 2.3**). La classe 0 inclut les puits contenant des cultures qui ne se sont pas développées (similaires à l'intensité observée lors de l'inoculation). Les classes 1, 2 et 3 incluent les puits contenant des cultures avec une croissance respectivement faible, modérée et forte. Ainsi, à chaque puit a été attribuée une classe pour la croissance.

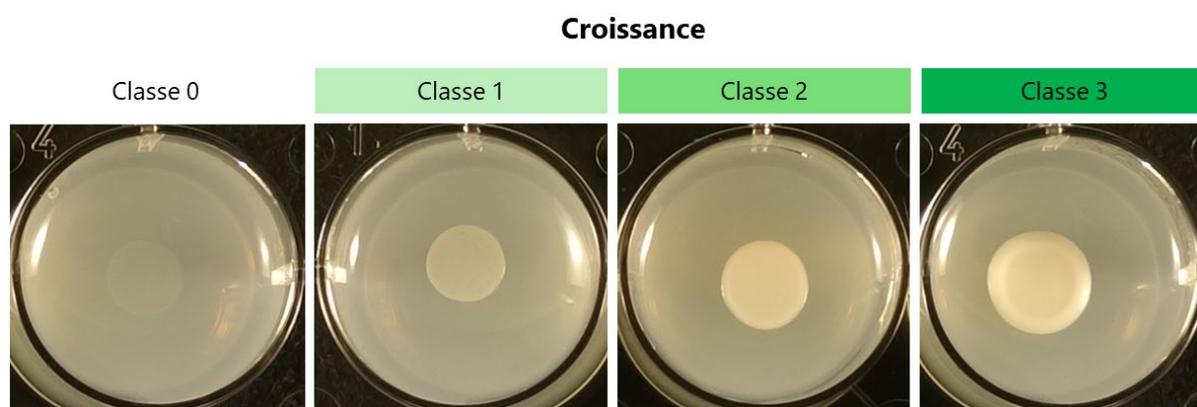


Figure 2.3. Classification visuelle des cultures (dans les puits) selon l'intensité de croissance en surface. Une photo représentative de chaque classe est présentée.

Pour l'invasion, ces mêmes 612 puits ont été observés après lavage et une échelle d'intensité définie en 4 classes a également été établie (**Figure 2.4**). La classe 0 inclut les puits dans lesquelles il n'y a pas eu d'invasion (similaire à une gélose vierge). Les classes 1, 2 et 3 incluent les puits présentant une invasion respectivement faible, modérée et forte. Ainsi, à chaque puit a été attribué une classe pour l'invasion.

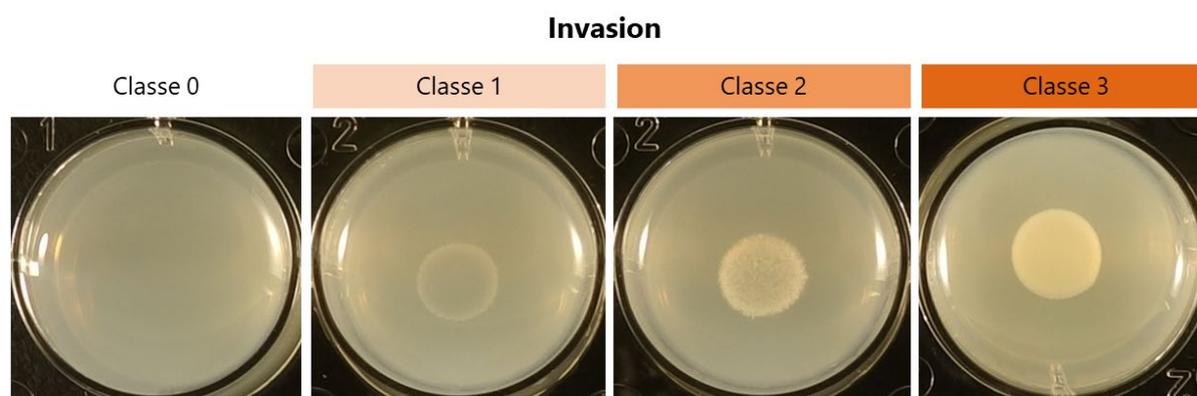


Figure 2.4. Classification visuelle des cultures (dans les puits) selon l'intensité d'invasion de la gélose. Une photo représentative de chaque classe est présentée.

Pour chaque condition, une classe moyenne a été attribuée à partir des 3 essais biologiques pour la croissance et pour l'invasion. Si les 3 essais ne présentaient pas la même classe, la classe majoritaire a été attribuée.

2.3.4.2. Analyse informatique de l'invasion

En parallèle de l'analyse visuelle de l'invasion, les photos d'invasion ont été analysées informatiquement à l'aide de scripts de traitements d'image (Matlab, version 2019b) : la détection des puits et des zones d'invasion a été obtenue par transformée de Hough circulaire (les puits et les zones d'invasion étant circulaires) et l'analyse de l'intensité d'invasion a été réalisée par étude du niveau de gris à l'intérieur des cercles (les zones d'invasion étant blanchâtres).

Premièrement, chaque photo a été convertie en niveau de gris sur 8 bits (256 nuances de gris) selon la formule $0,2989 \times \text{Rouge} + 0,5870 \times \text{Vert} + 0,1240 \times \text{Bleu}$. Un équilibrage de l'histogramme a été réalisé dans le but d'optimiser la dynamique de l'image et le contraste. Une correction de l'homogénéité de la lumière a été appliquée, ainsi qu'un filtre gaussien ($\sigma = 2$, taille du noyau = 9×9) pour lisser l'image et atténuer l'impact du bruit sur les niveaux de gris des pixels.

Deuxièmement, les puits des plaques de culture ont été détectés par l'application de la transformée de Hough circulaire (Atherton and Kerbyson, 1999) afin de cibler les zones de la photo où se situent les zones d'invasion (**Figure 2.5**). Chaque puit identifié (cercle rouge) a été traité individuellement et une nouvelle détection de cercle a été appliquée avec la transformée de Hough circulaire pour détecter les cercles plus petits, correspondants aux zones d'invasion (cercle vert). Pour chaque zone d'invasion, le niveau gris médian des pixels de la zone a été calculé (Drees *et al.*, 2005; Zupan and Raspor, 2008).

Ainsi, pour chacun des 612 puits analysés, si une zone d'invasion a été détectée, une valeur numérique relative au niveau de gris a été déterminée. Dans le cas contraire, le puit a été noté non détecté.

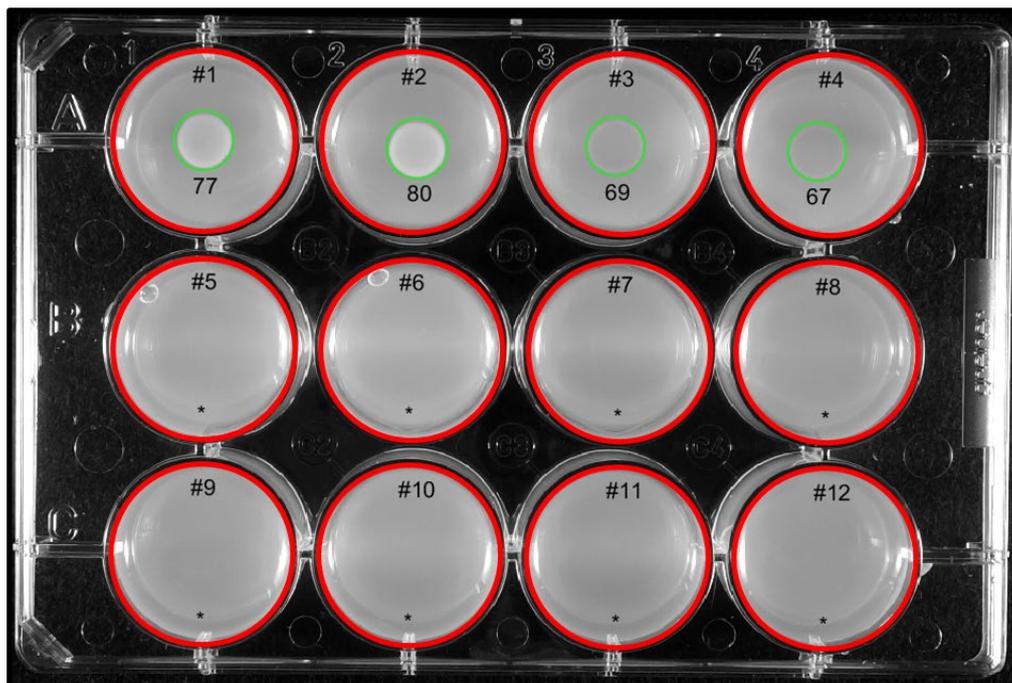


Figure 2.5. Exemple d'une photo d'invasion après traitement par l'algorithme. Zone rouge : détection du puit. Zone verte : détection de la zone d'invasion. #x : numéro du puit. Signe * : pas de détection de zone d'invasion. La valeur chiffrée est le niveau de gris médian des pixels de la zone d'invasion.

Une classification en 4 classes a été établie à partir des niveaux de gris et a été comparée à la classification visuelle décrite précédemment. Tout d'abord, la classe 0 inclut les puits où aucune zone d'invasion n'a été détectée par l'algorithme. Ensuite, la méthode de partitionnement k-means (logiciel R version 4.0.1) a été utilisée pour établir 3 classes informatiques (classes 1, 2 et 3) à partir des valeurs de niveau de gris pour les puits contenant une zone d'invasion détectée (115 puits) (**Tableau 2.3**).

Tableau 2.3. Classification informatique de l'invasion selon le niveau de gris obtenu après application de la méthode de partitionnement k-means. La classe 0 inclut les cultures non détectées. Les classes 1, 2 et 3 incluent les cultures détectées qui sont réparties selon le niveau de gris.

	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Intervalle	ND	[65,0 ; 70,5]]70,5 ; 77,5]]77,5 ; 87,0]

Ainsi, pour chaque condition, la moyenne du niveau de gris des 3 essais biologiques a été calculée et une classe informatique a été attribuée à partir de cette valeur moyenne.

2.4. Test d'adhésion

2.4.1. Cultures

Les souches 14, LO2E2, 61 et 2 qui ont présenté des capacités d'invasion différentes, ont été utilisées pour tester l'impact des nutriments sur la capacité de *B. bruxellensis* à adhérer. A partir

des stocks glycérolés à -80°C, 5 mL de YPD liquide ont été inoculés et incubés à 28°C pendant 6 jours. Les cultures ont ensuite été repiquées deux fois dans du milieu frais pour obtenir des cultures dans le même état physiologique. Une fois la fin de la phase exponentielle atteinte, les cellules ont été lavées avec de l'eau stérile après centrifugation (5000g – 5min – 20°C) puis la concentration des cultures a été ajustée à une $DO_{600nm} = 0,05$ ($1 DO_{600nm} = 1,0 \times 10^7$ UFC/mL) dans les différents milieux liquides T+, GL et CØ (**Tableau 2.1**).

2.4.2. Adhésion sur coupon d'acier inoxydable

Des coupons d'acier inoxydable (25 mm × 25 mm, Goodfellow, 316L, France) ont été immergés dans 15 mL de milieu liquide inoculé (décrit dans le paragraphe 2.4.1.) et incubés à 28°C. Les populations cellulaires sur le coupon ont été déterminées après 24 h d'incubation. Pour chaque condition (souche, milieu), 3 essais biologiques ont été réalisés. Les coupons ont été collectés et placés dans 15 mL d'eau physiologique stérile. Les cellules ont été détachées par sonication (3 min, puissance max) (Branson CPXH1800H-E ; Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, USA). La concentration de cellules détachées du coupon a été déterminée par dénombrement sur YPD gélosé après dilution en cascade et incubation à 28°C. Pour chaque souche, un test de Student a été utilisé pour comparer les données de chaque milieu au milieu complet T+ (logiciel R version 4.0.1).

3. Résultats

3.1. Etude de la croissance en surface et de l'invasion chez *B. bruxellensis*

Dans cette étude, seize souches de *B. bruxellensis* ont été cultivées sur cinq milieux gélosés différents. Une grande diversité de comportements a été observée, allant de l'absence de croissance en surface ou d'invasion jusqu'à un développement important à la surface (**Données complémentaires, Figure 2.S1**) et dans la gélose (**Données complémentaires, Figure 2.S2**).

3.1.1. Croissance en surface de la gélose

La capacité de *B. bruxellensis* à se développer en surface des milieux gélosés a été évaluée après 7 jours d'incubation en aérobiose. Pour cela, les cultures ont été photographiées (**Données complémentaires, Figure 2.S1**) et une classe visuelle a été attribuée à chaque condition permettant de les comparer (**Tableau 2.4**). Pour l'ensemble des souches, exceptée la souche AWR1499, la croissance à la surface a été importante sur le milieu complet T+. Une croissance modérée a été observée sur les milieux GL (glucose à 0,1%), EO (éthanol à 2%), EL (éthanol à 0,1%) et CØ (sans glucose ni éthanol). La souche AWR1499 présentait globalement une

croissance toujours plus faible que les autres souches sur l'ensemble des milieux.

La même expérience a été menée en anaérobiose (**Données complémentaires, Tableau 2.S1**). Seuls le milieu complet T+ et le milieu GL contenant du glucose à 0,1% ont permis la croissance faible à modérée de l'ensemble des souches à la surface de la gélose.

Tableau 2.4. Evaluation de la croissance de seize souches de *Brettanomyces bruxellensis* sur des milieux gélosés contenant différentes sources de carbone en aérobiose. Pour chaque condition, une classe a été attribuée selon la classification visuelle établie en Figure 2.3. T+ : milieu complet ; GL : glucose limité ; EO : éthanol optimal ; EL : éthanol limité ; CØ : sans glucose ni éthanol.

	Souche												AWRI 1499	CDR 219	LO2E2	LO417
	2	7	9	11	14	17	20	32	49	60	61	63				
T+	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3
GL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Milieu EO	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
EL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
CØ	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2

3.1.2. Caractérisation de l'invasion de la gélose

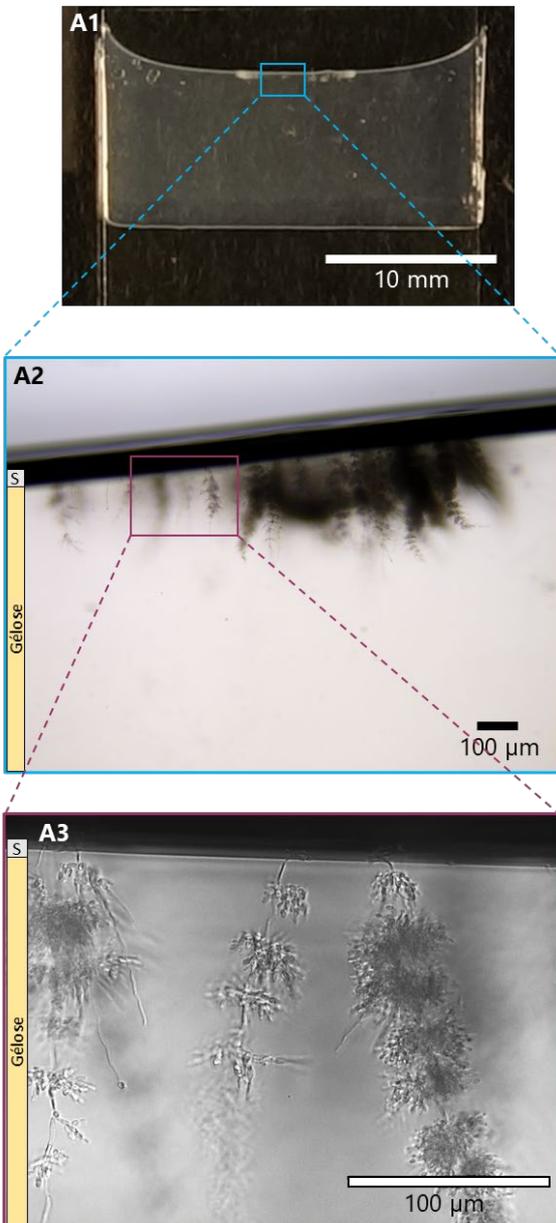
Par la suite, la totalité des cultures a été lavée pour éliminer la biomasse en surface de la gélose et faire apparaître la biomasse développée à l'intérieur de la gélose en cas d'invasion de cette dernière. Les cultures ont été photographiées pour évaluer la capacité d'invasion des souches de *B. bruxellensis* (**Données complémentaires, Figure 2.S2**).

En complément des vues de dessus, l'invasion de gélose a été étudiée au moyen de coupes longitudinales permettant d'estimer la profondeur de pénétration de la gélose (**Figure 2.6**). D'un point de vue macroscopique, différentes intensités de pénétration dans la gélose sont apparues. Dans le cas d'une faible invasion (**Figure 2.6A1**), la zone envahie était clairsemée, hétérogène et majoritairement concentrée au niveau des bords des cultures. Dans le cas d'une forte invasion (**Figure 2.6B1**), la zone envahie était dense, homogène et pouvait atteindre jusqu'à 1,2 mm de profondeur.

Des observations microscopiques (grossissement $\times 10$) ont permis d'observer en détail ces zones envahies, révélant ainsi la présence de filaments partant de la surface de la gélose et orientés vers l'intérieur de la gélose. Ces filaments étaient présents en plus ou moins grand nombre selon l'intensité de l'invasion (**Figures 2.6A2 et 2.6B2**). D'autres observations microscopiques (grossissement $\times 40$) ont été réalisées, permettant de caractériser la morphologie des cellules et l'architecture des structures développées à l'intérieur de la gélose lors de l'invasion. Ces observations ont permis de révéler notamment la présence de filaments, avec

des ramifications (**Figures 2.6A3 et 2.6B3**).

A. Faible invasion



B. Forte invasion

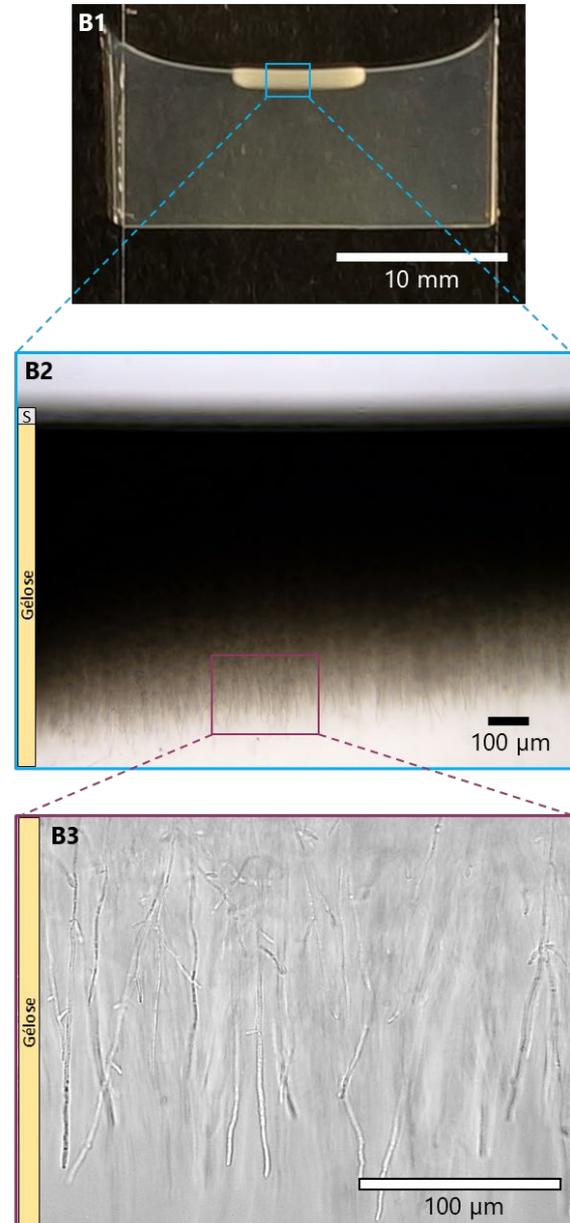


Figure 2.6. Vues latérales de la gélose lors (A) d'une faible invasion et (B) d'une forte invasion par *Brettanomyces bruxellensis*. (1) Vue macroscopique d'une coupe entre lame et lamelle. (2) Observations microscopiques ($\times 10$) des zones envahies (microscope B-383Pli). (3) Observations microscopiques ($\times 40$) des cellules dans les zones envahies (Microscope EVOS® FL). A gauche des observations microscopiques sont symbolisés la gélose et sa surface (S).

Grâce aux observations microscopiques, une grande diversité de structures multicellulaires a été mise en évidence à l'intérieur de la gélose (**Figure 2.7**). Ces structures pouvaient être composées de quelques cellules levures uniquement (**Figure 2.7A**) ou agrégées sous forme sphérique (**Figure 2.7B et 2.7G**), avec croissance filamenteuse (**Figure 2.7D**). D'autres

structures étaient constituées de cellules levures et de filaments variables selon la longueur et la fréquence de ramifications (**Figure 2.7C, 2.7E, 2.7F, 2.7G, 2.7H, 2.7I, 2.7J**). La majorité de ces structures semblent s'être mises en place suite à la pénétration de cellule unique dans la gélose qui se déploie ensuite à l'intérieur de la gélose pour produire chacune ces structures multicellulaires (**Figures 2.7E, 2.7F, 2.7G, 2.7H et 2.7I**). De plus, la présence d'éléments « chlamydospore-like » a été observée (**Figure 2.7J**).

Il faut noter que l'ensemble de ces diverses structures sont facilement observables uniquement en cas de faible invasion et de faible densité de cellules. Lorsque l'invasion devient plus importante, les filaments se développent au point qu'il n'est plus possible de distinguer les autres structures multicellulaires.

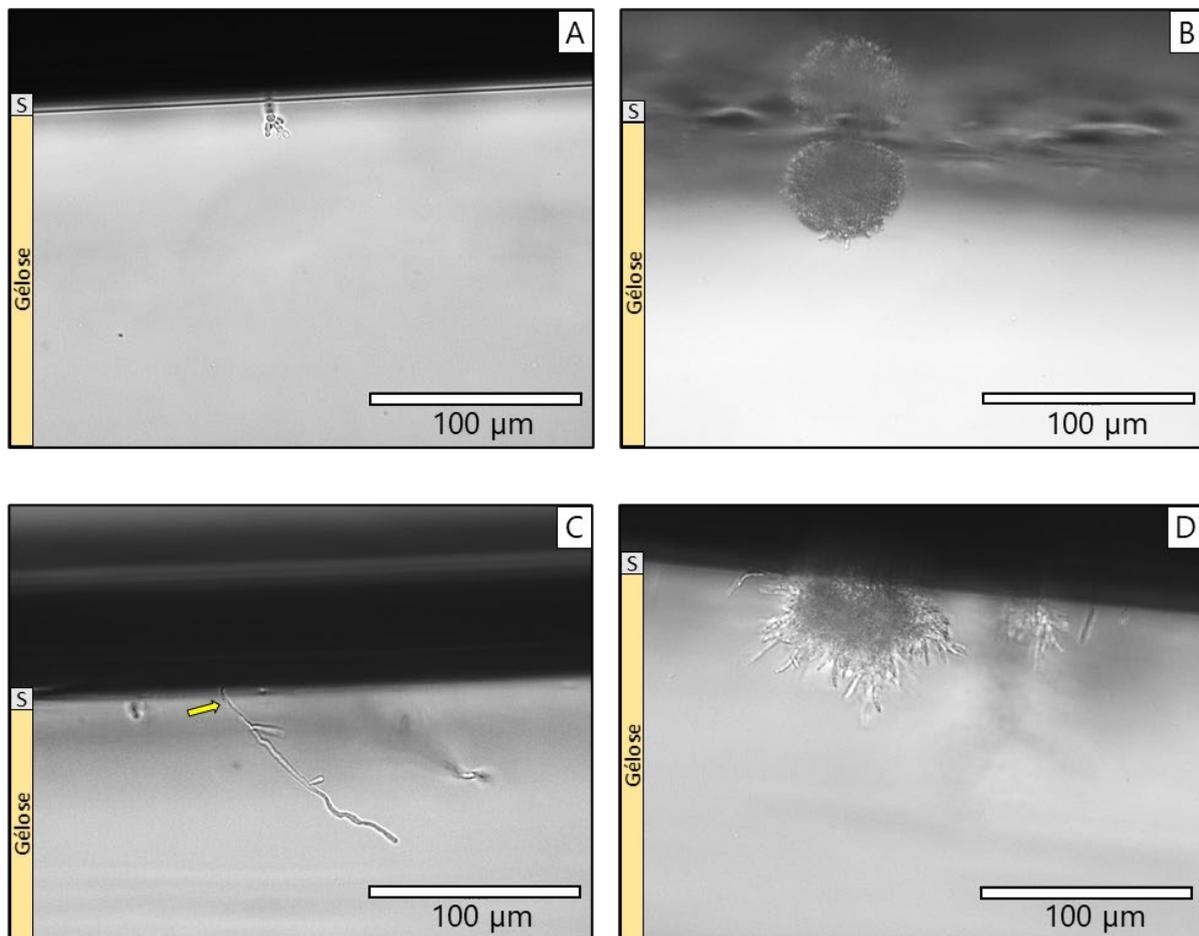


Figure 2.7. Exemples de différentes structures multicellulaires observées à l'intérieur de la gélose lors de la croissance invasive de *Brettanomyces bruxellensis*. A gauche des observations microscopiques sont symbolisées la gélose et sa surface (S). Les flèches jaunes indiquent les cellules à l'origine des structures multicellulaires. La flèche blanche indique un élément « chlamydospore-like ».

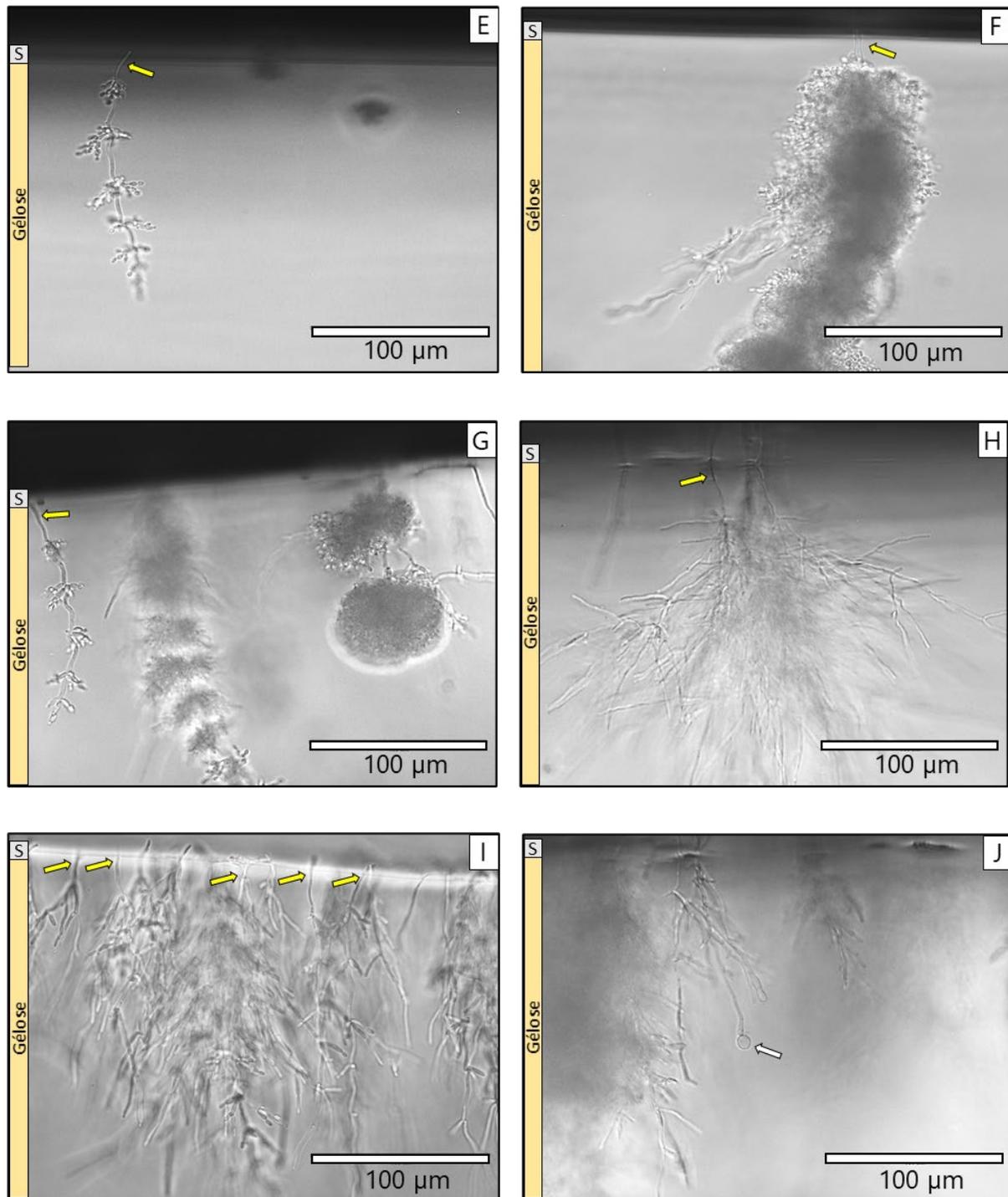


Figure 2.7 (Suite). Exemples de différentes structures multicellulaires observées à l'intérieur de la gélose lors de la croissance invasive de *Brettanomyces bruxellensis*. A gauche des observations microscopiques sont symbolisées la gélose et sa surface (S). Les flèches jaunes indiquent les cellules à l'origine des structures multicellulaires. La flèche blanche indique un élément « chlamydo-spore-like ».

Pour évaluer la capacité d'invasion de *B. bruxellensis* selon les conditions testées, une analyse visuelle au niveau macroscopique a été effectuée et une classe a été attribuée à chaque condition (**Données complémentaires, Tableau 2.S2**). Cependant, ce traitement visuel et manuel des images pour analyser un grand nombre de conditions est chronophage, subjectif et

laborieux. Ainsi, un script informatique a été créé afin d'automatiser la classification permettant de la rendre plus fiable et plus rapide.

3.1.3. Traitement informatique de l'invasion

La capacité d'invasion de *B. bruxellensis* a été quantifiée en se basant sur les niveaux de gris des zones d'invasion à partir des photos des 612 puits d'invasion disponibles.

Tout d'abord, l'efficacité de détection de l'algorithme a été examinée (**Données complémentaires, Figure 2.S3**). Premièrement, l'algorithme a détecté les zones d'invasion. Parmi 111 puits présentant une invasion visuellement détectable, l'algorithme a détecté une zone d'invasion dans 109 puits (98,20%). Parmi 501 puits dans lesquels aucune invasion n'a été perçue visuellement, l'algorithme n'a pas détecté de zone d'invasion pour 495 de ces puits (98,80%). Ces résultats indiquent une grande efficacité de l'algorithme à détecter les zones d'invasion et à discriminer les puits contenant de l'invasion ou non.

Deuxièmement, si une zone d'invasion a été détectée, l'algorithme a calculé une valeur médiane du niveau de gris des pixels de la zone d'invasion détectée, reflétant l'intensité d'invasion. Afin de déterminer si l'analyse informatique peut se substituer à l'analyse visuelle pour étudier l'invasion, une classification informatique en 4 classes a été établie à partir des niveaux de gris. Chacun des 612 puits, ayant déjà une classe visuelle, s'est vu attribué une classe informatique, permettant ainsi la comparaison entre ces 2 classifications (**Figure 2.8**). La diagonale représente les puits pour lesquels la même classe a été attribuée par la classification visuelle et par la classification informatique. La correspondance entre les 2 classifications est de 95,1%. En focalisant sur l'évaluation de l'intensité d'invasion (classes 1, 2 et 3), le consensus est de 79,8%. La classe 2 établie visuellement a été retrouvée par l'algorithme (20/23 puits soit 87,0%), mais une partie des puits classifiés classe 2 en informatique a été attribuée à la classe 1 visuellement (18/41 puits soit 44,0%). Les classes 0 et 3 établies informatiquement et visuellement présentaient une forte correspondance (>98,8% et 96,7% respectivement).

Etant donné le fort consensus entre la classification informatique et la classification visuelle, l'outil informatique développé dans cette étude peut se substituer à la comparaison visuelle classiquement utilisée, rendant ainsi l'analyse de l'invasion plus rapide.

		Classe visuelle				
		0	1	2	3	
Classe informatique	0	495	2	0	0	99,6%
	1	4	38	2	0	86,4%
	2	2	18	20	1	48,8%
	3	0	0	1	29	96,7%
		98,8%	65,5%	87,0%	96,7%	

Figure 2.8. Comparaison des résultats des deux méthodes de classification de l'invasion chez *Brettanomyces bruxellensis*.

3.1.4. Impact des sources de carbone sur l'invasion de *B. bruxellensis*

Pour évaluer et comparer la capacité d'invasion de *B. bruxellensis* selon les conditions testées (différentes sources de carbone en nature et en concentration), l'analyse d'image a été utilisée pour attribuer les classes à chacune des conditions (**Tableau 2.5**).

Tableau 2.5. Attribution des classes informatiques pour l'ensemble des conditions testées en aérobiose selon différentes sources de carbone. Pour chaque condition, la moyenne du niveau de gris de 3 essais a été calculée puis une classe a été attribuée. Le signe * indique la classe majoritaire en cas d'hétérogénéité entre les 3 essais biologiques. T+ : milieu complet ; GL : glucose limité ; EO : éthanol optimal ; EL : éthanol limité ; CØ : sans glucose ni éthanol.

	Souche												AWRI 1499	CDR 219	LO2E2	LO417
	2	7	9	11	14	17	20	32	49	60	61	63				
T+	3	2	2	3	3	3	3	2	3	2	0	2	1	0	3	1
GL	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	0	1*	2	1*
Milieu																
EO	0	0	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EL	0	0	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CØ	0	0	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Après 7 jours d'incubation en aérobiose, une zone d'invasion a été observée seulement pour les milieux T+ et GL. Malgré une forte croissance sur le milieu T+ pour l'ensemble des souches (croissance modérée pour la souche AWRI1499) (**Tableau 2.5**), une hétérogénéité de la capacité d'invasion est apparue entre les souches : les souches 2, 11, 14, 17, 20, 49 et LO2E2 ont fortement envahi la gélose, les souches 7, 9, 32, 60 et 63 l'ont modérément envahi et les souches AWRI1499 et LO417 l'ont faiblement envahi. Pour les souches 61 et CDR219, il y

avait une absence d'invasion. Sur milieu GL, pour lequel l'ensemble des souches présentaient une croissance modérée et homogène, toutes les souches exceptées les souches 61 et AWR11499 ont envahi la gélose faiblement. Seules les souches 14, LO2E2 et 2 présentent une classe d'invasion plus importante. Il semble ainsi que la capacité d'invasion soit souche-dépendante. Par ailleurs, aucun des autres milieux (EO, EL et CØ) n'a permis l'invasion de la gélose bien que la croissance en surface des géloses ait été similaire à celle observée sur le milieu GL.

Après 7 jours d'incubation en anaérobiose, même s'il y a eu croissance pour certaines conditions, aucune souche n'a envahi la gélose quel que soit le milieu considéré (**Données complémentaires, Figure 2.S2**).

Ainsi, l'impact de différentes sources de carbone sur la capacité de *B. bruxellensis* à se développer à la surface de la gélose et à l'envahir ont pu être évaluée. Il a été mis en évidence que les souches étudiées ont pu se développer à la surface de tous les milieux testés en aérobiose. En revanche en anaérobiose, seuls les milieux contenant du glucose ont permis la croissance de l'ensemble des souches (plus faible qu'en aérobiose). De plus, quelques différences entre les souches ont été observées. Par ailleurs, la capacité d'invasion de *B. bruxellensis* apparaît comme une caractéristique souche-dépendante. Néanmoins, l'ensemble des résultats révèlent que la présence d'éthanol comme source de carbone et l'absence d'oxygène ne permettent pas à *B. bruxellensis* d'envahir la gélose. La présence de glucose et d'oxygène sont des conditions favorables pour l'invasion de gélose par *B. bruxellensis*. Plus la concentration en glucose est élevée, plus l'invasion est forte. Ainsi, ce criblage a permis de sélectionner des conditions nutritionnelles (présence de glucose et d'oxygène) favorables à l'invasion de la gélose par *B. bruxellensis* et pouvant potentiellement favoriser l'adhésion et/ou la formation de biofilm, compte tenu des similitudes entre ces deux phénotypes chez d'autres espèces (gènes, facteurs environnementaux déclencheurs communs).

3.2. Impact des sources de carbone sur la capacité d'adhésion de *B. bruxellensis*

L'impact de la disponibilité en glucose sur la capacité d'adhésion de *B. bruxellensis* en aérobiose a été évaluée. Pour cela, quatre souches ont été utilisées : les trois souches présentant la plus grande capacité d'invasion (souches 14, LO2E2 et 2) et la souche ne présentant aucune invasion (souche 61). La population adhérente au coupon a été quantifiée après 24h d'incubation

dans les différents milieux contenant des concentrations variables en glucose (T+, GL, CØ). L'adhésion des cellules sur les coupons était observable pour l'ensemble des conditions testées (**Figure 2.9**). Lorsque la présence de glucose était limitée (0,1%), la population adhérente n'a pas été affectée, excepté pour la souche LO2E2 pour laquelle la population a diminué par rapport au milieu T+ contenant 2% de glucose. En revanche, l'absence totale de glucose (milieu CØ) a entraîné une diminution significative de la population adhérente par rapport au milieu T+ pour les quatre souches testées.

Cette étude préliminaire semble indiquer que l'absence de glucose semble diminuer l'adhésion chez *B. bruxellensis*.

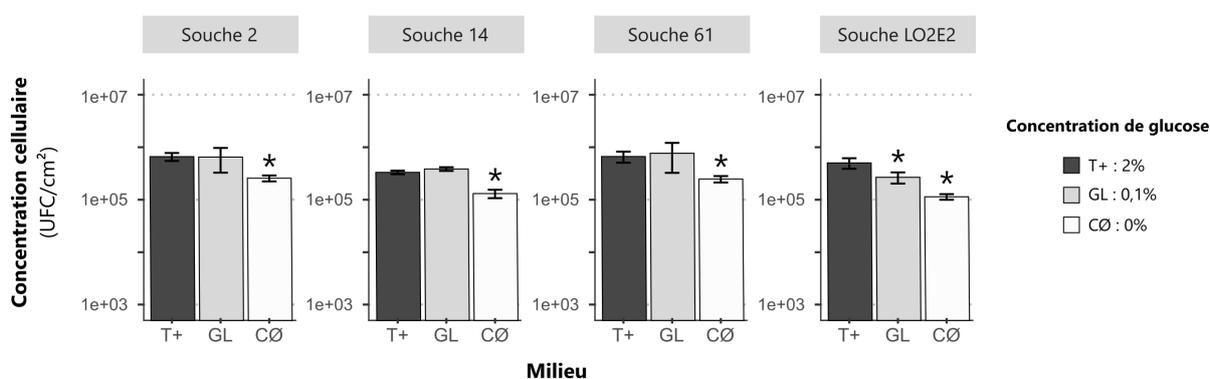


Figure 2.9. Population de *Brettanomyces bruxellensis* adhérente sur coupon d'acier inoxydable après 24h dans différents milieux contenant différentes sources de carbone. Le signe * indique une différence significative par rapport au milieu T+ (t-test, p -value $\leq 0,05$).

3.3. Lien entre capacités d'invasion de gélose et d'adhésion chez *B. bruxellensis* ?

Les capacités d'invasion de gélose et d'adhésion sur coupons ont été comparées selon différentes concentrations de glucose pour quatre souches de *B. bruxellensis* (**Tableau 2.6**). Les quatre souches de *B. bruxellensis* étudiées ont été capables d'adhérer au support pour l'ensemble des conditions nutritionnelles testées (T+, GL et CØ). En revanche, seules les souches 14, LO2E2 et 2 ont été capables d'envahir la gélose et uniquement dans les milieux T+ et GL. Ainsi, l'absence d'invasion ne signifie pas une incapacité d'adhésion. Pour ces mêmes souches dans le milieu CØ, une absence d'invasion coïncide avec une diminution de la capacité d'adhésion.

Dans les conditions de notre étude, il semble que l'invasion et l'adhésion ne puissent être reliées systématiquement. Néanmoins, il serait souhaitable d'étudier d'autres souches pour être en mesure de conclure sur le lien invasion/adhésion chez l'espèce *B. bruxellensis*.

Tableau 2.6. Comparaison des capacités de croissance en surface de gélose, d'invasion de gélose et d'adhésion de quatre souches de *B. bruxellensis* en présence de différentes concentrations en glucose (T+ : 2%, GL : 0,1%, CØ : 0%). Les couleurs pour la croissance en surface et l'invasion correspondent aux classes définies en Figures 2.3 et 2.4 respectivement. Les couleurs pour l'adhésion indiquent un niveau de population relatif au milieu T+ pour chaque souche (si la couleur est la même qu'en T+, le niveau de population est similaire ; si la couleur est plus claire qu'en T+, le niveau de population est significativement plus faible qu'en T+).

Souche	Milieu	Croissance en surface	Invasion	Adhésion
2	T+	Vert foncé	Orange foncé	Bleu foncé
	GL	Vert clair	Orange clair	Bleu clair
	CØ	Vert clair	Blanc	Bleu très clair
14	T+	Vert foncé	Orange foncé	Bleu foncé
	GL	Vert clair	Orange clair	Bleu clair
	CØ	Vert clair	Blanc	Bleu très clair
61	T+	Vert foncé	Orange foncé	Bleu foncé
	GL	Vert clair	Blanc	Bleu clair
	CØ	Vert clair	Blanc	Bleu très clair
LO2E2	T+	Vert foncé	Orange foncé	Bleu foncé
	GL	Vert clair	Orange clair	Bleu clair
	CØ	Vert clair	Blanc	Bleu très clair

4. Discussion

La croissance invasive n'avait encore jamais été décrite chez *B. bruxellensis*. Il semblait important dans un premier temps de caractériser cette capacité invasive et d'évaluer les effets de différentes concentrations en sources de carbone.

4.1. La capacité d'invasion chez *B. bruxellensis* en fonction de différentes sources de carbone

Avant d'évaluer la capacité d'invasion, il faut d'abord s'assurer que la levure peut se développer dans les conditions testées et qu'une absence d'invasion n'est pas due à une absence de croissance (Zupan and Raspor, 2008).

En aérobiose, la nature de la source de carbone (glucose ou éthanol) ne semble pas impacter dans notre étude la croissance de *B. bruxellensis*, espèce décrite comme pouvant utiliser une grande diversité de sources de carbone (Conterno *et al.*, 2006; Smith and Divol, 2016). En anaérobiose, seule la présence de glucose a pu assurer une croissance des cellules. D'autres auteurs décrivent également une croissance des cellules suite à l'assimilation de l'éthanol

comme seule source de carbone uniquement en présence d'oxygène, aussi bien chez *B. bruxellensis* que chez *S. cerevisiae* (Conterno *et al.*, 2006; Piškur *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2004; Smith and Divol, 2018). En effet, chez les levures, la production d'énergie à partir de l'éthanol nécessite des étapes d'oxydation pour produire de l'acétyl-CoA alimentant le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire et produisant de l'ATP par phosphorylation oxydative (Galdieri *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'absence d'oxygène limite la croissance à partir du glucose, en accord avec de précédentes études (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2003; Blomqvist *et al.*, 2012; Capusoni *et al.*, 2016). Cette observation peut s'expliquer par un gain énergétique plus faible en métabolisme fermentaire par rapport à la voie respiratoire à partir du glucose.

Ensuite, au cours de ce travail, l'ensemble des souches ont présenté une croissance sur le milieu CØ (sans glucose ni éthanol). Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette croissance. Il se peut que les levures aient utilisé les autres composés présents dans le milieu de base comme sources de carbone. Il a été reporté que des souches de *Brettanomyces* spp. pouvaient croître sur un milieu ne contenant que de l'agar (Cibrario, 2017; Galafassi *et al.*, 2011). L'agar, qui est majoritairement utilisé pour solidifier les milieux, est un polymère de galactose, une source de carbone métabolisable par *B. bruxellensis* (Conterno *et al.*, 2006; Crauwels *et al.*, 2015). Par ailleurs, il se peut également que les cellules se soient développées grâce aux réserves intracellulaires (Conterno *et al.*, 2006) ou à partir des lysats cellulaires.

4.1.1. Caractérisation de l'invasion chez *B. bruxellensis*

Après avoir évalué la croissance dans les différentes conditions de culture, la capacité d'invasion jamais décrite jusqu'à présent chez *B. bruxellensis* a été étudiée pour les mêmes conditions de culture.

Ainsi, il a été mis en évidence que des souches de cette espèce sont capables d'envahir la gélose et ce jusqu'à 1,2 mm sous la surface de la gélose pour certaines modalités. Cette profondeur d'invasion est comparable à ce qui peut être observé chez d'autres espèces de levures. Chez *S. cerevisiae*, des profondeurs de 0,9 à 1,5 mm ont été décrits lors de l'invasion de milieu gélosé (2% d'agar) contenant du galactose (milieu YEP-gal) ou 2% de glucose (milieu YPD), respectivement (Chow *et al.*, 2019; Zupan and Raspor, 2008). D'après une étude chez *C. albicans*, la profondeur d'invasion est inversement corrélée à la concentration d'agar du milieu gélosé (Warena *et al.*, 2003). Dans un milieu sérum de veau bovin (BCS) contenant de 0,5% à 3% d'agar, la profondeur d'invasion de *C. albicans* passe de 0,84 mm à 0,47 mm (0,65 mm à 2% d'agar).

Par observations microscopiques de la zone d'invasion, nous avons mis en évidence la présence de cellules levures et de filaments (pouvant comprendre de nombreuses ramifications) organisés en structures multicellulaires à l'intérieur de la gélose. Chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*, la présence de cellules levures et de filaments a également été observée par microscopie en bordures de la zone d'invasion et s'étendant à sa périphérie (Csank and Haynes, 2000; Cullen and Sprague, 2000; Kontoyiannis *et al.*, 2001; Naseem *et al.*, 2020). De plus, certaines études (chez *S. cerevisiae*, *C. albicans* et *Schizosaccharomyces pombe*) se sont intéressées à l'organisation des cellules à l'intérieur de la gélose (au moyen de coupes longitudinales) (Amoah-Buahin *et al.*, 2005; Cullen and Sprague, 2000; Kumamoto, 2005). Des structures composées de filaments s'étendant de la surface vers l'intérieur de la gélose ont été décrites et sont similaires à certaines structures observées au cours de ce travail chez *B. bruxellensis* (**Figures 2.6A2, 2.6A3, 2.7A, 2.7I**). Cependant, ces travaux réalisés chez d'autres levures que *B. bruxellensis* ne décrivent pas autant de diversité de structures, arrêtant leur analyse sur la seule présence de filaments et n'allant pas jusqu'à la description de l'architecture de ces structures. Dans notre étude, en regardant à l'échelle de chaque structure multicellulaire, la majorité étaient issues de la pénétration d'une cellule unique dans la gélose qui s'est ensuite développée à l'intérieur de la gélose. Ainsi, les structures multicellulaires ont pour origine leur position initiale à la surface de la gélose et se propagent à l'intérieur de la gélose. Chez d'autres levures, ces observations suggèrent que la capacité à former des filaments et à envahir la gélose seraient un avantage sélectif pour les cellules levures non mobiles, pour rechercher des nutriments dans une zone distante et pour échapper à des composés néfastes dans la zone initiale (Bauer and Pretorius, 2001; Gimeno *et al.*, 1992; Sanati Nezhad and Geitmann, 2013).

Enfin, chez *B. bruxellensis*, la présence d'éléments « chlamyospore-like » a été remarquée au sein de ces structures développées à l'intérieur de la gélose. Ces éléments ont déjà été observés chez *B. bruxellensis* dans des cultures planctoniques et dans des biofilms, mais leur rôle reste encore inconnu (Lebleux *et al.*, 2020). La production de ces éléments peut représenter un indice supplémentaire montrant l'adaptation des cellules à leur environnement, puisque les chlamydozoospores sont décrites comme des formes de résistance chez d'autres fungi (Ojeda-Robertos *et al.*, 2009).

4.1.2. Impact de sources de carbone sur la capacité d'invasion de *B. bruxellensis*

L'effet de différentes sources de carbone sur la capacité d'invasion de *B. bruxellensis* a été évalué. Dans notre étude, l'invasion de gélose n'a été observée qu'en présence de glucose (2%

et 0,1%) et d'oxygène excepté pour la souche 61 pour laquelle aucune invasion n'a été observée. De plus, il a été montré qu'une faible disponibilité en glucose (0,1%) n'a pas favorisé l'invasion en comparaison avec le milieu complet T+ (2% glucose) chez *B. bruxellensis*, comme déjà observé dans une autre étude pour plusieurs souches d'*Hanseniaspora uvarum* lors de l'abaissement de la concentration en glucose de 2% à 0,5% (González *et al.*, 2018). En revanche, une faible disponibilité en glucose (0,1% ou 0,5% glucose) favorise la croissance invasive chez d'autres espèces levuriennes comme *Metschnikowia pulcherrima* et *S. cerevisiae* (González *et al.*, 2018; Zupan and Raspor, 2010). De plus, l'absence de glucose a conduit à une absence d'invasion dans notre étude, même dans les cas où le glucose a été remplacé par de l'éthanol. D'après la littérature, il se trouve au contraire que d'autres espèces (*M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*) ont la capacité d'invasion d'envahir la gélose en présence d'éthanol (Zaragoza and Gancedo, 2000).

Ainsi, la capacité d'invasion semble variable entre les espèces, *B. bruxellensis* faisant probablement partie des espèces qui présentent une capacité d'invasion plus élevée en milieu riche, comme *Saccharomyces paradoxus* (Roop and Brem, 2013). De plus, les résultats obtenus dans cette étude suggèrent des différences de capacité d'invasion au sein de l'espèce *B. bruxellensis*. Ce phénotype pourrait être en lien avec le groupe génétique des souches, comme déjà décrit pour le niveau de ploïdie, la résistance au SO₂, au chitosane ou la morphologie des cellules levures, mais cela reste à confirmer (Avramova *et al.*, 2018b; Lebleux *et al.*, 2021; Paulin *et al.*, 2020). Des analyses génétiques pourraient être conduites sur les souches présentant des capacités d'invasion différentes pour identifier des gènes liés à ce phénotype chez *B. bruxellensis*. Chez *S. cerevisiae*, de nombreux gènes ont été décrits pour leur implication dans la croissance invasive. En particulier, il faut considérer le gène *FLO11* régulé par un promoteur de grande taille vers lequel convergent de multiples voies de signalisation (Andersen *et al.*, 2014; Cullen and Sprague, 2012). Ce gène code pour une floculine (ou adhésine), une protéine retrouvée à la surface des cellules. Cette protéine est impliquée dans l'adhésion des cellules à un substrat ou entre elles, également requise pour l'invasion de milieux gélifiés (Guo *et al.*, 2000). En effet, il a été montré qu'une mutation du gène *FLO11* chez une souche de *S. cerevisiae* empêche la formation de pseudohyphes, l'invasion de gélose (Lo and Dranginis, 1998) mais également la formation de biofilm (Andersen *et al.*, 2014). Ainsi, l'expression de ce gène chez *B. bruxellensis* ou le comportement d'une souche délétée pour ce gène pourraient être étudiés afin d'élucider les voies de signalisation impliquées dans ces phénotypes chez cette levure d'altération, et *in fine*, identifier les signaux déclencheurs de leur mise en place.

4.1.3. Pipeline d'acquisition et traitement d'images

Dans la littérature, l'invasion de gélose chez d'autres micro-organismes est communément évaluée par une analyse et comparaison visuelle (Andersen *et al.*, 2014; Carstens *et al.*, 1998; Casalone *et al.*, 2005; Torbensen *et al.*, 2012). Dans le cas d'un grand nombre d'échantillons, ce type d'analyse est chronophage et subjective. Ainsi, il est souhaitable de standardiser et d'automatiser autant que possible le protocole. A cette fin, certaines études font un usage effectif d'outils de traitement d'images (Quantity One, Dapple, ImageJ, MIPAR) pour analyser un grand nombre de photos d'invasion (Cullen, 2015; Drees *et al.*, 2005; Dunn *et al.*, 2020; Zupan and Raspor, 2008). Dans ce travail, nous avons mis en place un pipeline d'acquisition et de traitement d'images pour tendre vers une standardisation, une automatisation et une reproductibilité plus importante. Une analyse informatique applicable directement après l'étape d'acquisition standardisée des photos permet un traitement automatique de l'invasion, la rendant plus robuste, objective et rapide. L'algorithme utilisé dans cette étude a été très efficace pour détecter les cas d'invasion et discriminer différentes intensités d'invasion. Un très faible nombre de faux-positifs a été identifié par l'algorithme. Ces faux positifs correspondent à des puits avec une invasion biologiquement considérée comme nulle en comparaison avec ce qui est décrit dans la littérature (Andersen *et al.*, 2014). Le fort consensus (95,1%) entre les classifications visuelle et informatique confirme la fiabilité du pipeline. Cette analyse informatique peut ainsi se substituer à l'analyse visuelle classiquement utilisée.

Il peut être noté que certaines confusions sont apparues, probablement dues à la fois à la subjectivité de l'opérateur lors de la classification visuelle de l'invasion servant de « vérité de terrain » et à des défauts dans le protocole d'acquisition mis en évidence lors de l'analyse numérique. Par exemple, malgré les précautions prises, la luminosité entre les photos et les puits d'une même plaque pouvait être légèrement différente mais suffisante pour être perçue par l'algorithme qui a pu ainsi placer dans deux classes différentes, deux puits qui visuellement semblaient identiques. Enfin, la quantification des niveaux de gris et la répartition en 4 classes pose souci pour les valeurs à l'interface entre 2 classes (par exemple, le maximum de la classe 1 et facilement confondable avec le minimum de la classe 2).

Ainsi, plusieurs points pourraient être améliorés ou perfectionnés. Par exemple, en plus d'une meilleure homogénéisation de la lumière, il peut être souhaitable d'utiliser des géloses plus fines et donc moins opaque pour augmenter la dynamique des valeurs numériques des niveaux de gris et obtenir ainsi une meilleure discrimination. Des perfectionnements pourraient être apportés à l'algorithme également. Par exemple, la mesure d'intensité du niveau de gris

des pixels de la zone d'invasion pourrait être couplée à d'autres variables telles que la mesure de profondeur d'invasion afin d'améliorer la discrimination. En travaillant sur les différents points décrits ci-dessus, l'analyse d'image pourrait fournir des valeurs numériques utilisables pour une analyse quantitative plutôt que qualitative.

4.2. L'adhésion chez *B. bruxellensis* en fonction de différences sources de carbone

Afin d'identifier les facteurs influençant ou non la formation de biofilm, nous avons évalué la capacité d'adhésion de quatre souches de *B. bruxellensis* sur acier inoxydable selon la disponibilité en glucose. Dans notre étude, une concentration en glucose de 0,1% n'a pas favorisée l'adhésion (24h) par rapport au témoin (2% de glucose). En revanche en absence de glucose, l'adhésion était systématiquement plus faible comparée au témoin. Ainsi, la faible disponibilité en nutriments ne semble pas favoriser l'adhésion chez *B. bruxellensis*. La comparaison de résultats entre différentes études est difficile compte tenu de la grande variabilité des protocoles et des compositions de milieux utilisés.

Chez *S. cerevisiae*, il a été montré que l'adhésion (6h) à un support plastique est favorisée à faible concentration de glucose (0,1%) par rapport à un milieu riche en glucose (2%) (Reynolds and Fink, 2001). En absence de glucose, des résultats dans la littérature divergent concernant l'adhésion de *S. cerevisiae* (3h ou 6h) qui serait augmentée ou réduite par rapport à un milieu riche (Reynolds and Fink, 2001; Van Nguyen *et al.*, 2020). Une étude menée chez *Candida glabrata* a montré que la population adhérente à 24h et à 48h sur un support plastique était plus faible à 0,1% que 2% de glucose pour une souche bien que l'inverse ait été observé pour deux autres souches (Ng *et al.*, 2016).

Finalement, en comparant les données d'invasion et d'adhésion, il semblerait que l'invasion et la capacité d'adhésion soit partiellement corrélées chez *B. bruxellensis*. Chez d'autres espèces de levures, différentes études ont mis évidence des corrélations partielles entre capacité invasive et capacité d'adhésion dans le cadre de l'étude de la formation de biofilm. Dunn *et al.* (2020) ont mis en évidence que l'invasion était corrélée à l'adhésion chez *C. albicans*, mais seulement en partie. En effet, la prédiction du comportement en biofilm ne peut être significative qu'en combinant les données d'invasion avec celles d'adhésion et de filamentation, et non prédite par un seul phénotype associé aux biofilms. Cela suggère donc que potentiellement, les capacités d'adhésion et d'invasion sont davantage complémentaires dans l'étude de la formation de biofilm. Chez *S. cerevisiae*, une étude a montré que les phénotypes invasion et adhésion au

polystyrène étaient faiblement corrélés (Hope and Dunham, 2014). Cela suggère que bien que ces phénotypes partagent des régulations communes (par exemple, activité *FLO11*), tous deux sont probablement régulés par des interactions génétiques plus complexes.

Par ailleurs, il a été montré que la structure et la composition du biofilm dépendaient de la composition du milieu (Daniels *et al.*, 2013; Pierce *et al.*, 2017). Ainsi, des observations par microscopie électronique ou confocale (avec utilisation de fluorochromes spécifiques) apporteraient des informations sur des potentielles modifications de structure du biofilm selon les nutriments présents (Serrano-Fujarte *et al.*, 2015; Weerasekera *et al.*, 2016). Ce type d'analyses permettraient d'étudier l'abondance et la composition de la matrice, élément essentiel participant à la résistance accrue associée au mode de vie biofilm (Flemming and Wingender, 2010; Zarnowski *et al.*, 2014) ou la teneur en filaments qui est corrélée à la solidité du biofilm (Paramonova *et al.*, 2009).

5. Conclusion

Dans cette étude, l'invasion de gélose chez *B. bruxellensis* a été caractérisée. Les structures développées à l'intérieur de la gélose sont diverses et possèdent des organisations spatiales différentes. Elles sont composées de cellules levures, de filaments plus ou moins ramifiés, parfois d'éléments chlamydospores-like. Les filaments semblent jouer un rôle important dans l'établissement de ce phénotype. De plus, la présence de glucose et d'oxygène apparaissent comme des conditions favorables à l'invasion de gélose par *B. bruxellensis*. Ces conditions permettent également l'adhésion des cellules à un support d'acier inoxydable. Cependant, si l'adhésion est diminuée par rapport au témoin milieu complet, elle est tout de même observée en absence de glucose, contrairement à l'invasion. Ainsi, ces phénotypes (invasion et adhésion) semblent partiellement corrélés chez l'espèce *B. bruxellensis* et sont probablement régulés à la fois par des mécanismes communs et différents.

Partie 2. Résultats complémentaires

1. Introduction

Dans la partie précédente, il a été montré que les sources de carbone contenues dans le milieu de culture pouvaient influencer la capacité d'invasion et d'adhésion de *B. bruxellensis*. En particulier, il semble qu'un milieu riche (notamment en glucose) favorise l'invasion de la gélose et l'adhésion à un support. D'après la littérature, la disponibilité en sources d'azote est décrite comme pouvant impacter également ces deux capacités chez d'autres levures, notamment favorablement en cas de faible disponibilité (González *et al.*, 2018; Zara *et al.*, 2011). Ainsi, dans cette partie, nous proposons une étude préliminaire de l'impact de sources d'azote (sulfate d'ammonium et acides aminés) sur la capacité d'invasion et d'adhésion de *B. bruxellensis*, connue pour avoir de faibles besoins en azote.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Souches

Dans cette partie de l'étude, quatre souches de *B. bruxellensis* (une par groupe génétique) ont été utilisées parmi les seize décrites dans la Partie 1 : souche 2, 7, 14 et 63. Les souches ont été stockées à -80°C en milieu YPD liquide contenant 20% v/v glycérol.

2.2. Milieux

La capacité d'invasion de *B. bruxellensis* a été testée sur différents milieux (**Tableau 2.7**), variables en sources d'azote (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000; Carstens *et al.*, 1998; Gimeno *et al.*, 1992). Les milieux ont été utilisés sous forme solide avec 2% m/v agar bactériologique (VWR) pour les tests de croissance invasive et sous forme liquide pour les tests d'adhésion. Le milieu de base contenait 0,17% m/v YNB sans acide aminé et sans sulfate d'ammonium (Sigma), 20 mg/L uracile et adénine, 20 g/L NaHCO₃ (Chemlab) et 2% de D-glucose (Sigma). Ce milieu de base a ensuite été supplémenté ou non avec différentes sources d'azote : 15 mM de sulfate d'ammonium (Honeywell) et/ou un mix d'acides aminés (Sigma) (**Tableau 2.2**). Les milieux ont été préparés selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 2.2.2.

Tableau 2.7. Composition des milieux gélosés utilisés pour évaluer la capacité de croissance en surface et la capacité d'invasion de *Brettanomyces bruxellensis*. + = présence, - = absence, * : concentration des acides aminés en Tableau 3. T+ : milieu complet ; AAØ : sans acides aminés ; ASØ : sans sulfate d'ammonium ; NØ : sans acides aminés ni sulfate d'ammonium.

Milieux	Agar 2%	YNB 0,17%, NaHCO ₃ 20g/L, Uracile, Adénine 20 mg/L	D-glucose	Sulfate d'ammonium 15 mM	Mix d'acides aminés*
Milieu complet	T+	+	2%	+	+
Milieux avec différentes sources d'azote	AAØ	+	2%	+	-
	ASØ	+	2%	-	+
	NØ	+	2%	-	-

2.3. Croissance en surface et invasion de la gélose

Chaque souche a été cultivée en milieu YPD pour ensuite inoculer les milieux selon le protocole décrit dans Partie 1, paragraphe 2.3.1. Les plaques de culture contenant les milieux gélosés inoculés ont été incubées 7 jours à 28°C en aérobiose.

Après incubation, les plaques de culture ont été photographiées avant et après lavage, pour évaluer la croissance en surface de la gélose et l'invasion de la gélose respectivement, selon le protocole décrit Partie 1, paragraphe 2.3.2. Pour chaque condition, la moyenne des classes de 3 essais biologiques a été attribuée pour la croissance et pour l'invasion, selon les classes définies en Partie 1, paragraphe 2.3.4.

2.4. Adhésion

Les souches 14 et 2 ont été utilisées pour tester la capacité d'adhésion de *B. bruxellensis* selon diverses disponibilités en sources d'azote. Les cultures préparées selon le protocole décrit Partie 1, paragraphe 2.4.1 ont servi à inoculer les milieux liquides T+, ASØ, AAØ, NØ (**Tableau 2.7**).

Des coupons d'acier inoxydable ont été immergés dans 15 mL de milieu liquide inoculé et incubé à 28°C. Après 24h, la population adhérente au coupon a été détachée et la concentration cellulaire a été déterminée selon le protocole décrit Partie 1, paragraphe 2.4.2. Trois essais biologiques ont été réalisés. Pour chaque souche, un test de Student a été utilisé pour comparer les données de chaque milieu au milieu complet T+ (logiciel R version 4.0.1).

3. Résultats et discussion

3.1. Impact de différentes sources d'azote sur la croissance en surface et la capacité d'invasion

Dans ce criblage, l'impact de différentes sources d'azote (présence ou absence de sulfate

d'ammonium et d'un mix d'acides aminés) sur la croissance en surface de quatre souches de *B. bruxellensis* a été étudié. La croissance sur les milieux gélosés en aérobiose a été évaluée après 7 jours d'incubation. Pour cela, les cultures ont été photographiées (**Données complémentaires, Figure 2.S4A**) et une classe visuelle a été attribuée à chaque condition permettant de les comparer (**Tableau 2.8A**). Comme pour le milieu T+, les souches 14, 2, 7 et 63 ont été capables de se développer sur milieu ASØ sans sulfate d'ammonium de manière importante. Une croissance similaire a été observée sur milieu AAØ sans acides aminés et une croissance plus faible sur le milieu sans sulfate d'ammonium ni acides aminés NØ excepté pour la souche 2 qui ne s'est pas développée sur ces 2 milieux (AAØ et NØ). L'apport d'acides aminés semble nécessaire pour la croissance de cette souche qui possède probablement un métabolisme différent des autres souches utilisées.

Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature qui décrit *B. bruxellensis* comme capable d'utiliser diverses sources d'azote pour se développer (Crauwels *et al.*, 2015; Parente *et al.*, 2018; Smith and Divol, 2016). L'ammonium et le L-glutamate sont des sources d'azote préférentielles pour *B. bruxellensis* (de Barros Pita *et al.*, 2011). Ce sont des molécules clés dans le métabolisme azoté central, pouvant être converties l'une en l'autre suite à l'intervention de glutamate déshydrogénase NADP ou NAD dépendante (Gobert, 2019). Ceci peut expliquer pourquoi la croissance est inchangée en l'absence soit de sulfate d'ammonium ou d'acides aminés, mais diminuée en l'absence de ces deux composés. Il est également connu que les besoins en azote de *B. bruxellensis* sont faibles. En effet, Aguilar-Uscanga *et al.* (2000) ont montré que dans un milieu sans sulfate d'ammonium (contenant glucose, sulfate de magnésium, potassium phosphate et extrait de levure), la biomasse maximale obtenue ne diminuait que de 30% par rapport au milieu complet. De plus, cette étude a indiqué que si 0,5 g/L semblaient suffisants pour couvrir les besoins en sulfate d'ammonium pour la croissance de *B. bruxellensis*, des concentrations supérieures à 2,0 g/L de sulfate d'ammonium inhibaient sa croissance.

Tableau 2.8. Evaluation de (A) la croissance en surface de gélose et (B) de l'invasion de gélose de seize souches de *Brettanomyces bruxellensis* sur des milieux gélosés contenant différentes sources d'azote en aérobiose. Pour chaque condition, une classe a été attribuée selon les classifications visuelles établies en Figure 3 pour la croissance et en Figure 4 pour l'invasion. T+ : milieu complet ; AAØ : sans acides aminés ; ASØ : sans sulfate d'ammonium ; NØ : sans acides aminés ni sulfate d'ammonium.

A	Souche				
	2	7	14	63	
Milieu	T+	3	3	3	3
	ASØ	3	3	3	3
	AAØ	0	3	3	3
	NØ	0	2	2	2

B	Souche				
	2	7	14	63	
Milieu	T+	3	2	3	2
	ASØ	3	2	3	2
	AAØ	0	1	3	0*
	NØ	0	2	1	1

Ensuite, les cultures ont été lavées pour éliminer la biomasse développée en surface. Les plaques de culture ont été photographiées (**Données complémentaires, Figure 2.S4B**) et la capacité d'invasion de *B. bruxellensis* a été évaluée suite à l'attribution de classe au moyen de l'analyse informatique (**Tableau 2.8B**). Les résultats ont été contrôlés visuellement par l'expertise humaine. Le comportement des souches était identique sur milieu T+ et sur milieu ASØ : toutes les souches testées présentaient une invasion importante, mais les souches 14 et 2 ont plus fortement envahi la gélose que les souches 7 et 63. Sur milieux AAØ et NØ, le comportement des souches était très hétérogène : seule la souche 14 a fortement envahi la gélose pour le milieu AAØ. A l'inverse, cette souche présentait une faible invasion sur milieu NØ. La souche 63 semblait peu capable d'envahir la gélose dans ces deux milieux. La souche 7 présentait un comportement opposé à la souche 14. Cela corrobore le caractère souche-dépendant de la capacité d'invasion de *B. bruxellensis*, déjà décrit dans la Partie 1. Quant à la souche 2, une absence d'invasion a été observée sur les milieux AAØ et NØ, résultant d'une absence de croissance sur ces milieux.

Dans cette étude, il semblerait que l'absence de sulfate d'ammonium n'impacte ni la croissance en surface ni l'invasion de gélose chez *B. bruxellensis*. Un comportement invasif a également été observé chez *M. pulcherrima*, *Torulaspora delbruecki* et *S. cerevisiae* lors d'une faible disponibilité en sulfate d'ammonium (González *et al.*, 2018; Zupan and Raspor, 2010). Cependant, le degré d'invasion dans ce milieu limité en sulfate d'ammonium (50 µM) était plus élevé que dans le milieu complet (37 mM). Chez *Schizosaccharomyces pombe*, l'absence d'azote a été identifiée comme un facteur déclencheur de la croissance invasive (Amoah-Buahin *et al.*, 2005). Vis-à-vis de la disponibilité en acides aminés, certaines souches *B. bruxellensis* nécessitaient la présence d'acides aminés pour envahir la gélose dans la présente étude, indiquant des comportements de croissance et d'invasion souche-dépendants. Dans la littérature, les acides aminés sont généralement absents de la composition des milieux, ne permettant pas de conclure à propos de leur l'impact sur la capacité d'invasion des levures (González *et al.*, 2018; Zupan and Raspor, 2010).

Ainsi, cette étude préliminaire a montré que le sulfate d'ammonium n'est pas un composé indispensable pour l'invasion de gélose par *B. bruxellensis*. Au contraire, la disponibilité en acides aminés semble influencer cette capacité, et ce de manière souche_dépendante. L'aspect souche-dépendant de la capacité d'invasion de gélose a également été observé chez *S. cerevisiae* (Klingberg *et al.*, 2008).

3.2. Impact de différentes sources d'azote sur la capacité d'adhésion

L'impact de ces différentes sources d'azote sur la capacité d'adhésion de *B. bruxellensis* a été évalué. Deux souches au comportement différent ont été utilisées : la souche 14 (capable d'invasion en absence de sulfate d'ammonium ou d'acides aminés) et la souche 2 (incapable de croissance et d'invasion en absence d'acides aminés). La population adhérente au coupon a été quantifiée après 24h d'incubation pour les différents milieux contenant différentes sources d'azote (T+, ASØ, AAØ, NØ) (**Tableau 2.7**). L'ensemble des conditions testées a permis l'adhésion des cellules au coupon (**Figure 2.10**). Les conditions ASØ et NØ n'ont pas impacté la capacité d'adhésion pour les deux souches testées par rapport au milieu complet T+. En revanche, l'absence d'acides aminés semblait favoriser significativement la population adhérente au coupon pour la souche 14 par rapport au milieu T+.

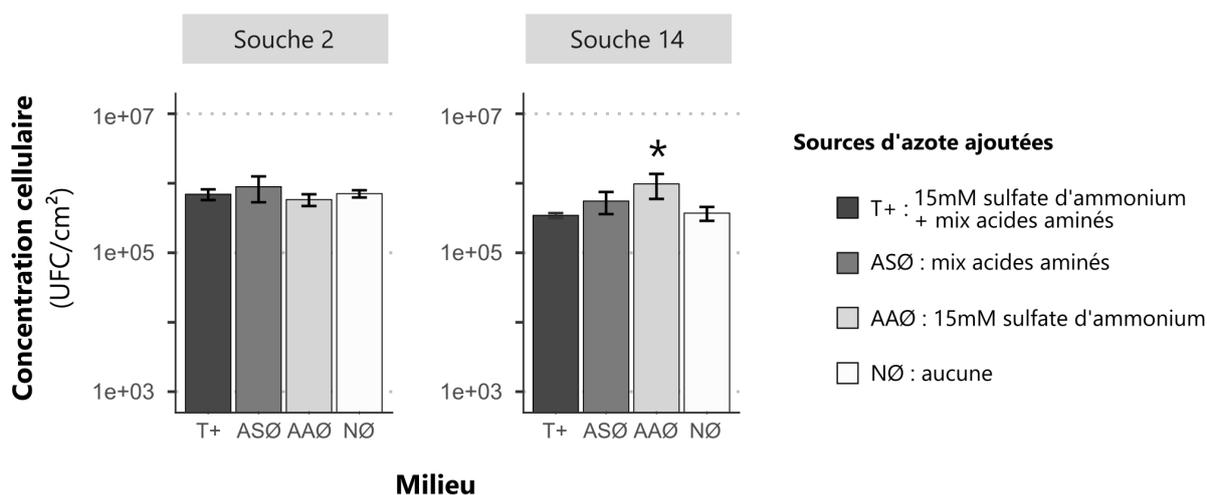


Figure 2.10. Population de *Brettanomyces bruxellensis* adhérente sur coupon d'acier inoxydable après 24h dans différents milieux contenant différentes sources d'azote. Le signe * indique une différence significative par rapport au milieu T+ (t-test, p -value $\leq 0,05$).

Cette étude préliminaire semble indiquer que l'absence de sulfate d'ammonium n'impacte pas la capacité d'adhésion de *B. bruxellensis*, comme déjà décrit chez *S. cerevisiae*. En effet, l'absence ou la faible disponibilité en sulfate d'ammonium n'a modifié ni la quantité de cellules adhérentes (4h) à une surface plastique, ni la quantité de biofilm (masse) formé à l'interface air-liquide par rapport à un milieu contenant 37,5 mM de sulfate d'ammonium (Sidari *et al.*, 2014; Zara *et al.*, 2011). De plus, chez *S. cerevisiae*, la présence de L-histidine ou de dipeptides contenant de l'histidine dans le milieu inhibe fortement la capacité d'adhésion au polystyrène et la formation de biofilm air-liquide (Bou Zeidan *et al.*, 2014). Dans notre étude, l'absence d'un mix d'acides aminés a semblé favoriser l'adhésion des cellules de la souche 14 au support

d'acier inoxydable. Ainsi, il serait alors pertinent de tester l'effet d'acides aminés uniques sur la capacité d'adhésion de *B. bruxellensis*.

3.3. Lien invasion / adhésion

Dans la Partie 1, il est apparu que les phénotypes d'invasion et d'adhésion étaient peu liés, en présence de différentes concentrations de glucose. La même analyse du lien entre ces deux phénotypes a été réalisée pour des conditions variantes en sources d'azote (**Tableau 2.9**).

De même que pour le carbone, les deux souches étudiées ont été capables d'adhérer au support pour l'ensemble des milieux testés (T+, ASØ, AAØ et NØ). Ces milieux ont également permis à la souche 14 d'envahir la gélose (faiblement pour la condition NØ). En revanche, la souche 2 n'a présenté ni croissance en surface de la gélose, ni invasion dans les milieux AAØ et NØ. Ces résultats corroborent la conclusion émise dans la Partie 1, indiquant que les phénotypes d'invasion et d'adhésion ne soient que peu liés. Ainsi, l'invasion ne semble pas être un indicateur efficace de la capacité d'adhésion chez *B. bruxellensis*, puisqu'un cas d'invasion correspond à un cas d'adhésion, mais que l'inverse n'est pas forcément vrai.

Tableau 2.9. Comparaison des capacités de croissance en surface de gélose, d'invasion de gélose et d'adhésion de quatre souches de *B. bruxellensis* en présence de différentes sources d'azote (T+ : 15 mM sulfate d'ammonium + mix d'acides aminés, ASØ : mix d'acides aminés, AAØ : 15 mM sulfate d'ammonium, NØ : Ø). Les couleurs pour la croissance en surface et l'invasion correspondent aux classes définies en Figures 2.3 et 2.4 respectivement. Les couleurs pour l'adhésion indiquent un niveau de population relatif au milieu T+ pour chaque souche (si la couleur est la même qu'en T+, le niveau de population est similaire ; si la couleur est plus foncée qu'en T+, le niveau de population est significativement plus élevé qu'en T+).

Souche	Milieu	Croissance en surface	Invasion	Adhésion
2	T+	Vert	Orange	Blue clair
	ASØ	Vert	Orange	Blue clair
	AAØ	Blanc	Blanc	Blue clair
	NØ	Blanc	Blanc	Blue clair
14	T+	Vert	Orange	Blue clair
	ASØ	Vert	Orange	Blue clair
	AAØ	Vert	Orange	Blue foncé
	NØ	Vert clair	Orange clair	Blue clair

Conclusion du chapitre 2

Dans ce chapitre, un phénotype a été nouvellement caractérisé chez l'espèce *B. bruxellensis* : l'invasion de gélose. Les cellules sont capables de se développer à l'intérieur de l'agar en formant diverses structures multicellulaires composés de filaments, de cellules levures et parfois de « chlamydo-spore-like ».

Cette capacité apparaît être dépendante de la souche et des nutriments disponibles dans le milieu. L'invasion de gélose semble être favorisée par la présence de glucose, d'acides aminés et d'oxygène. La substitution du glucose par de l'éthanol ne maintient pas ce phénotype. L'absence de sulfate d'ammonium ne semble pas impacter la capacité d'invasion de gélose chez les souches testées dans cette étude.

L'ensemble des conditions nutritionnelles testées dans cette étude ont permis l'adhésion des cellules de *B. bruxellensis* à un support d'acier inoxydable. La capacité d'adhésion semble diminuer en absence de glucose pour l'ensemble des souches testées et être favorisée en absence d'acides aminés pour une souche.

En somme, l'absence d'invasion de gélose ne signifie pas absence d'adhésion. Par conséquent, l'invasion ne constitue pas un outil efficace pour prédire les capacités d'adhésion chez *B. bruxellensis*. Ainsi, chez l'espèce *B. bruxellensis*, ces phénotypes (invasion et adhésion) sont probablement régulés à la fois par des mécanismes communs et différents.

Des travaux supplémentaires devront être menés avec davantage de souches pour confirmer les résultats obtenus dans cette étude.

Données complémentaires

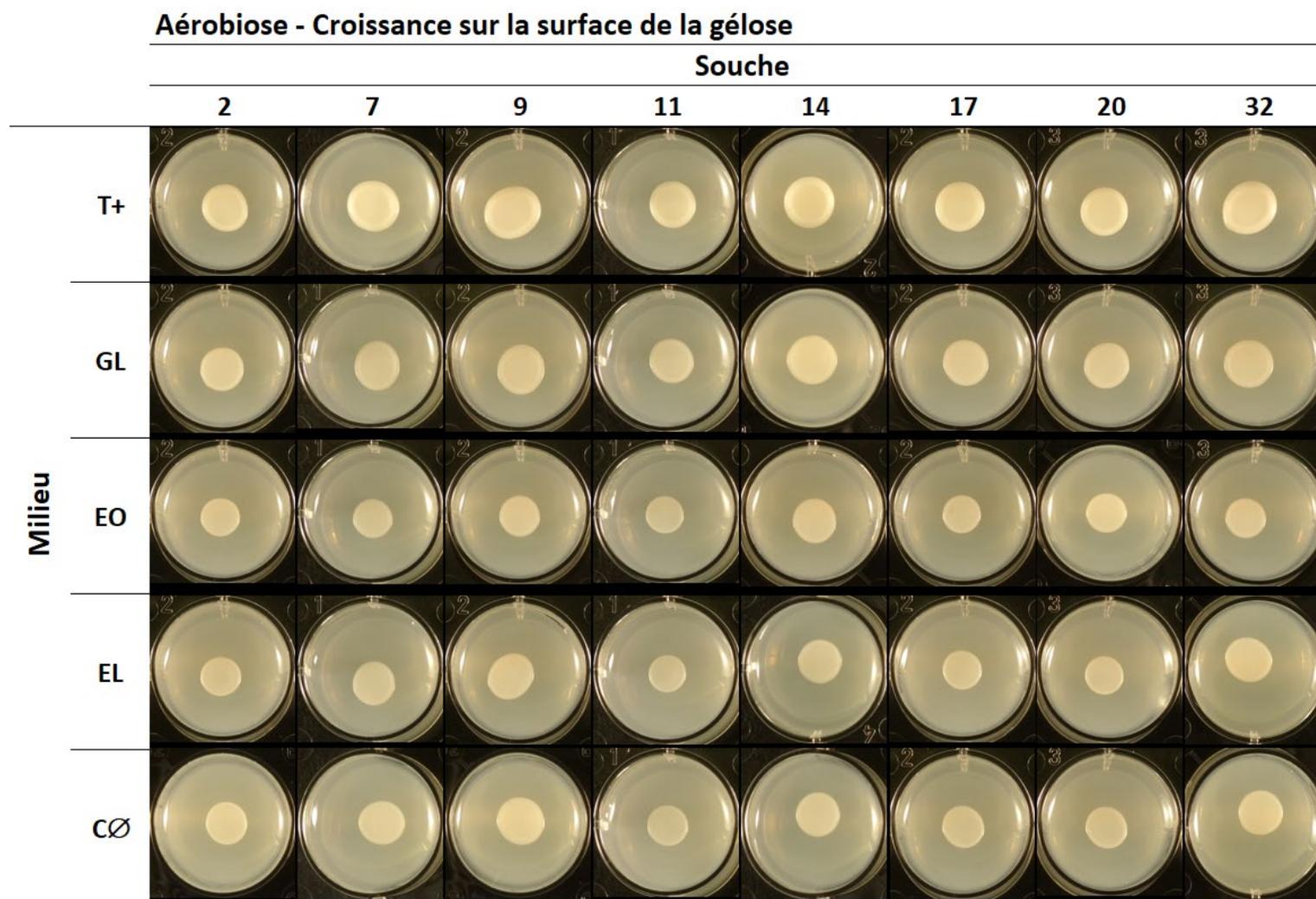


Figure 2.S1. Photos des cultures de seize souches de *Brettanomyces bruxellensis* sur différents milieux gélosés variables en source de carbone avant lavage (Croissance sur la surface de la gélose) après 7 jours d'incubation en aérobiose ou anaérobiose. T+ : milieu complet ; GL : glucose limité ; EO : éthanol optimal ; EL : éthanol limité ; CØ : sans glucose ni éthanol. (Suite sur la page suivante).

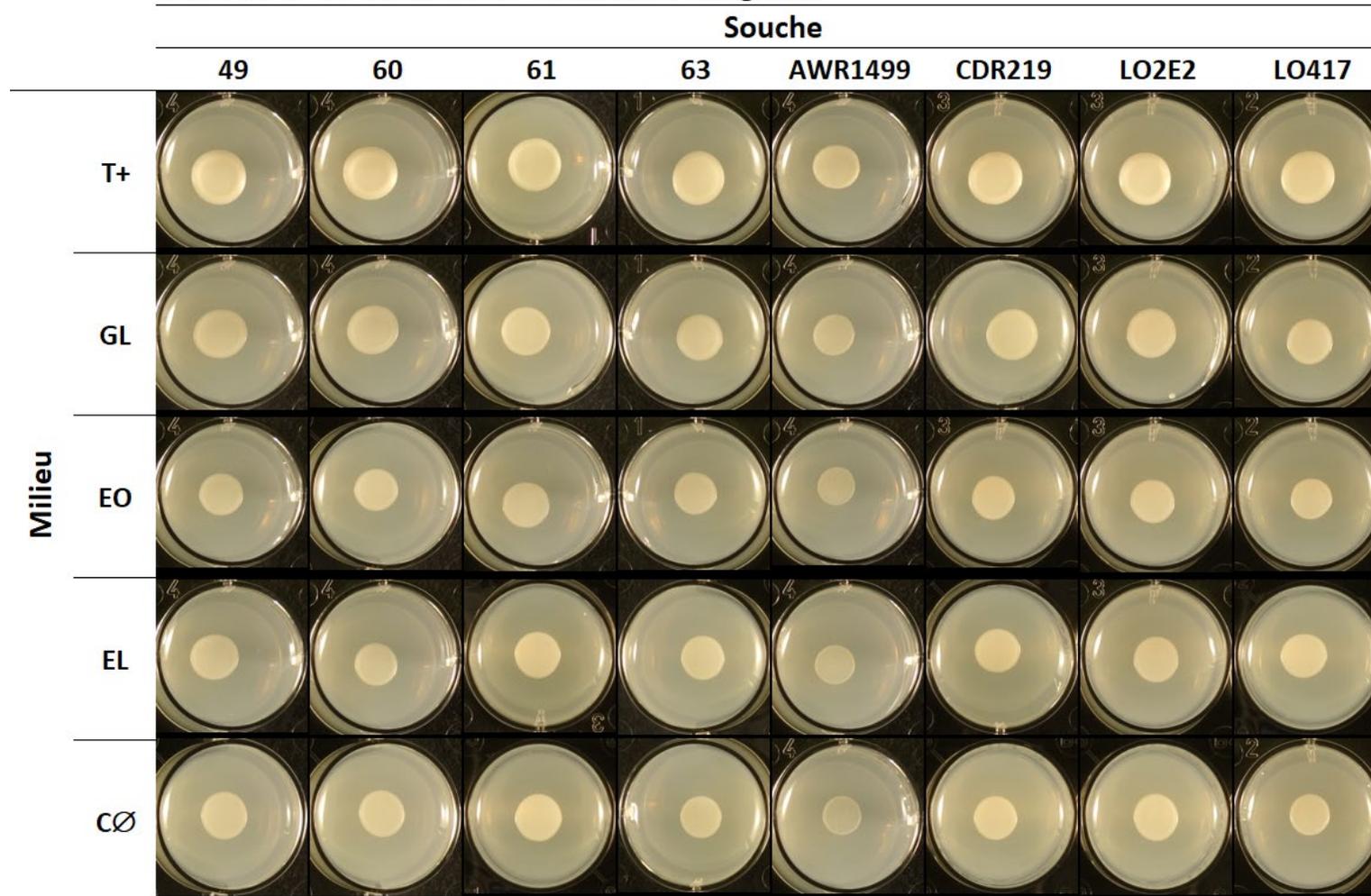
Aérobiose - Croissance sur la surface de la gélose

Figure 2.S1 (Suite). Photos des cultures de seize souches de *Brettanomyces bruxellensis* sur différents milieux gélosés variables en source de carbone avant lavage (Croissance sur la surface de la gélose) après 7 jours d'incubation en aérobiose ou anaérobiose. T+ : milieu complet ; GL : glucose limité ; EO : éthanol optimal ; EL : éthanol limité ; CØ : sans glucose ni éthanol. (Suite sur la page suivante).

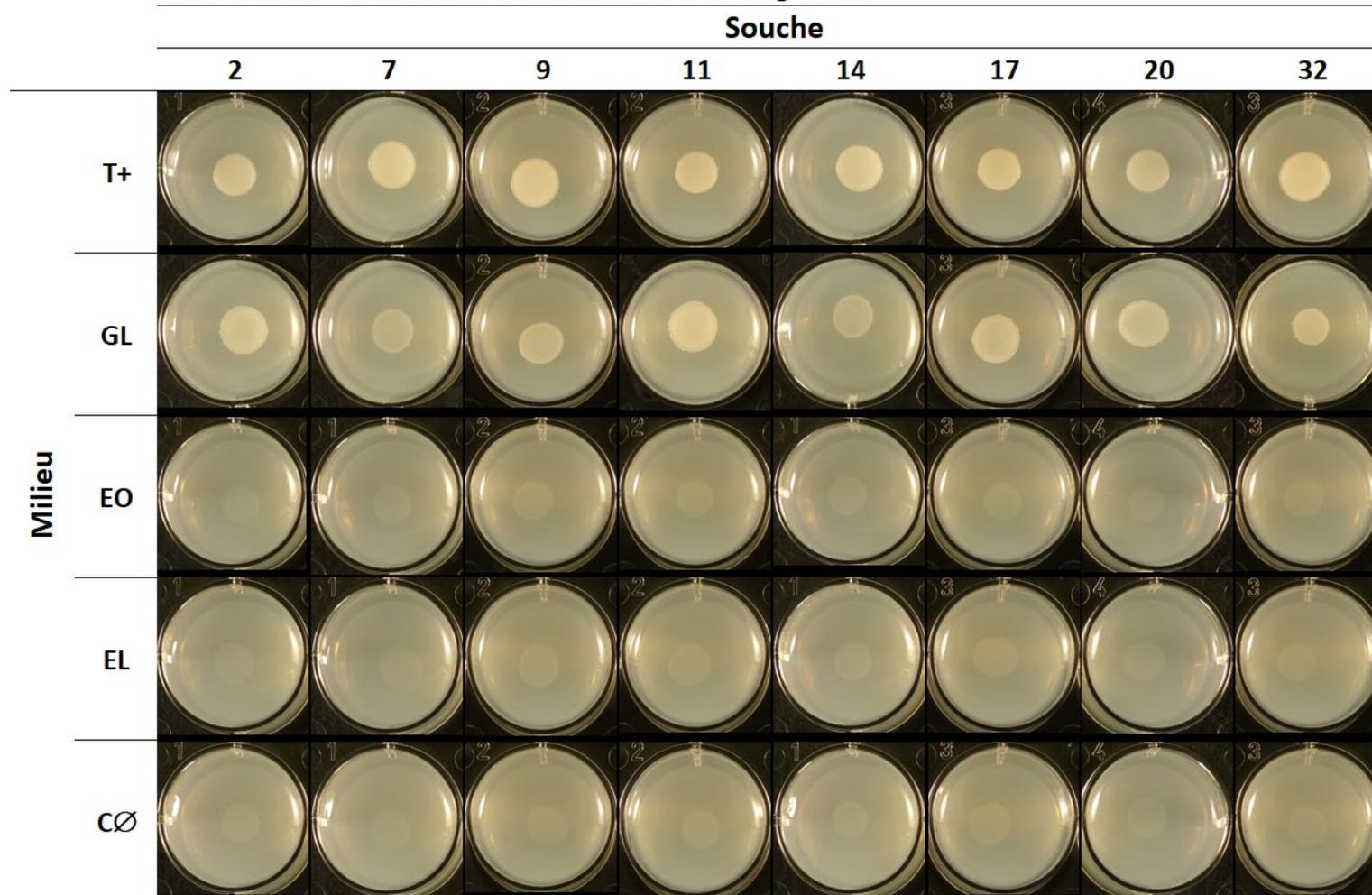
Anaérobiose - Croissance sur la surface de la gélose

Figure 2.S1 (Suite). Photos des cultures de seize souches de *Brettanomyces bruxellensis* sur différents milieux gélosés variables en source de carbone avant lavage (Croissance sur la surface de la gélose) après 7 jours d'incubation en aérobie ou anaérobiose. T+ : milieu complet ; GL : glucose limité ; EO : éthanol optimal ; EL : éthanol limité ; CØ : sans glucose ni éthanol. (Suite sur la page suivante).

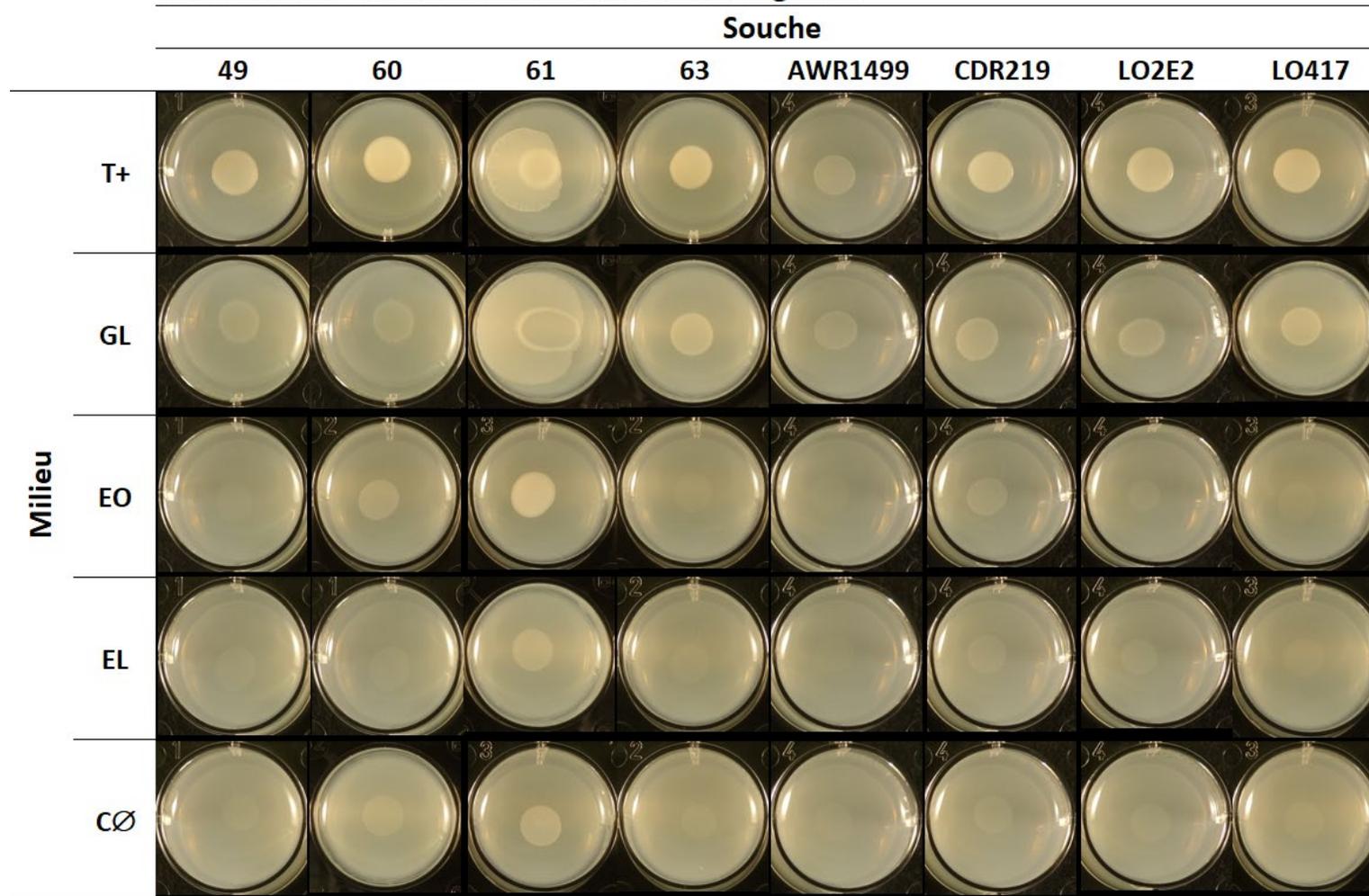
Anaérobiose - Croissance sur la surface de la gélose

Figure 2.S1 (Suite). Photos des cultures de seize souches de *Brettanomyces bruxellensis* sur différents milieux gélifiés variables en source de carbone avant lavage (Croissance sur la surface de la gélose) après 7 jours d'incubation en aérobiose ou anaérobiose. T+ : milieu complet ; GL : glucose limité ; EO : éthanol optimal ; EL : éthanol limité ; CØ : sans glucose ni éthanol.

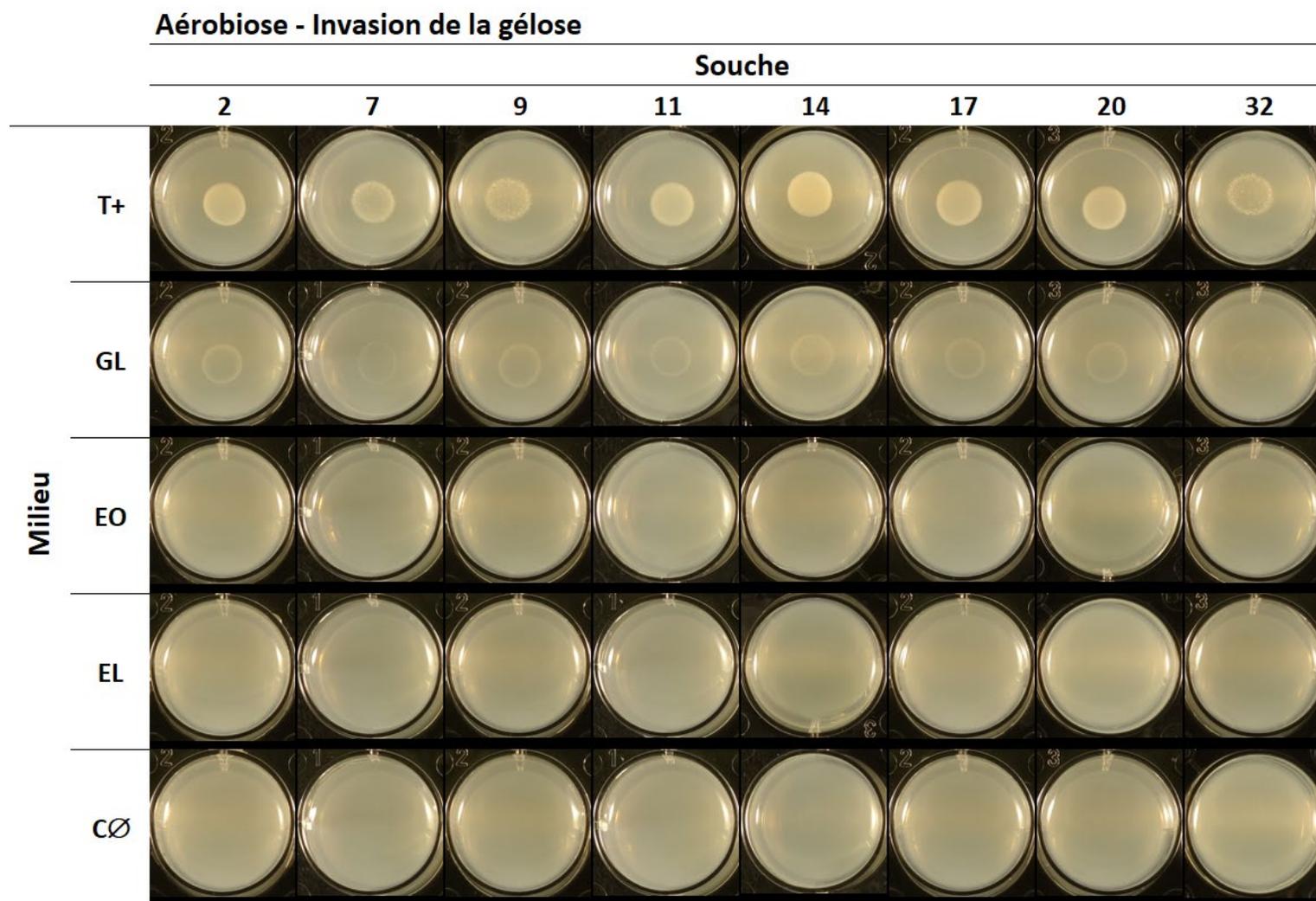


Figure 2.S2. Photos des cultures de seize souches de *Brettanomyces bruxellensis* sur différents milieux gélosés variables en source de carbone après lavage (Invasion de la gélose) après 7 jours d'incubation en aérobiose ou anaérobiose. T+ : milieu complet ; GL : glucose limité ; EO : éthanol optimal ; EL : éthanol limité ; CØ : sans glucose ni éthanol. (Suite sur la page suivante).

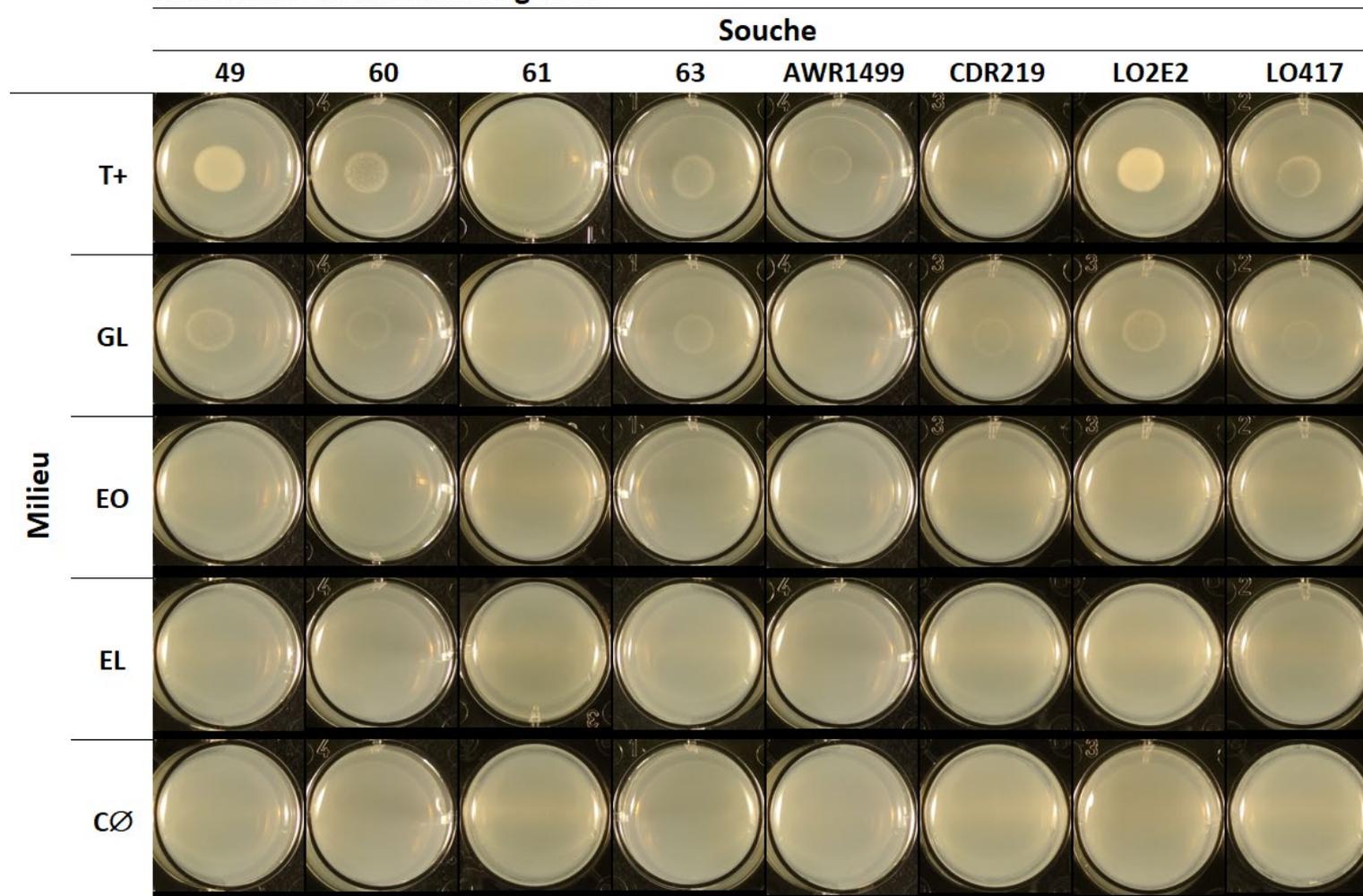
Aérobiose - Invasion de la gélose

Figure 2.S2 (Suite). Photos des cultures de seize souches de *Brettanomyces bruxellensis* sur différents milieux gélosés variables en source de carbone après lavage (Invasion de la gélose) après 7 jours d'incubation en aérobiose ou anaérobiose. T+ : milieu complet ; GL : glucose limité ; EO : éthanol optimal ; EL : éthanol limité ; CØ : sans glucose ni éthanol. (Suite sur la page suivante).

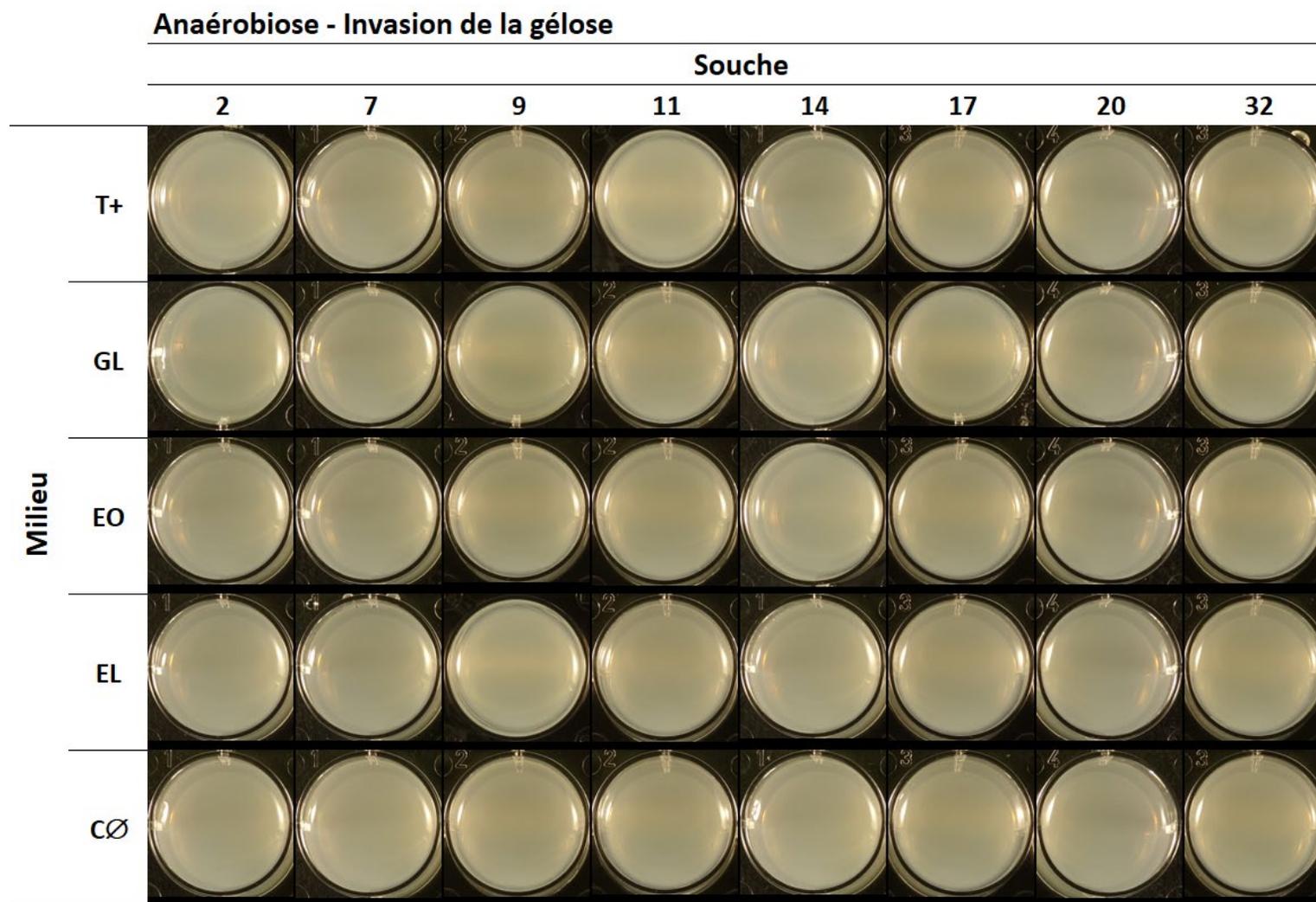


Figure 2.S2 (Suite). Photos des cultures de seize souches de *Brettanomyces bruxellensis* sur différents milieux gélosés variables en source de carbone après lavage (Invasion de la gélose) après 7 jours d'incubation en aérobiose ou anaérobiose. T+ : milieu complet ; GL : glucose limité ; EO : éthanol optimal ; EL : éthanol limité ; CØ : sans glucose ni éthanol. (Suite sur la page suivante).

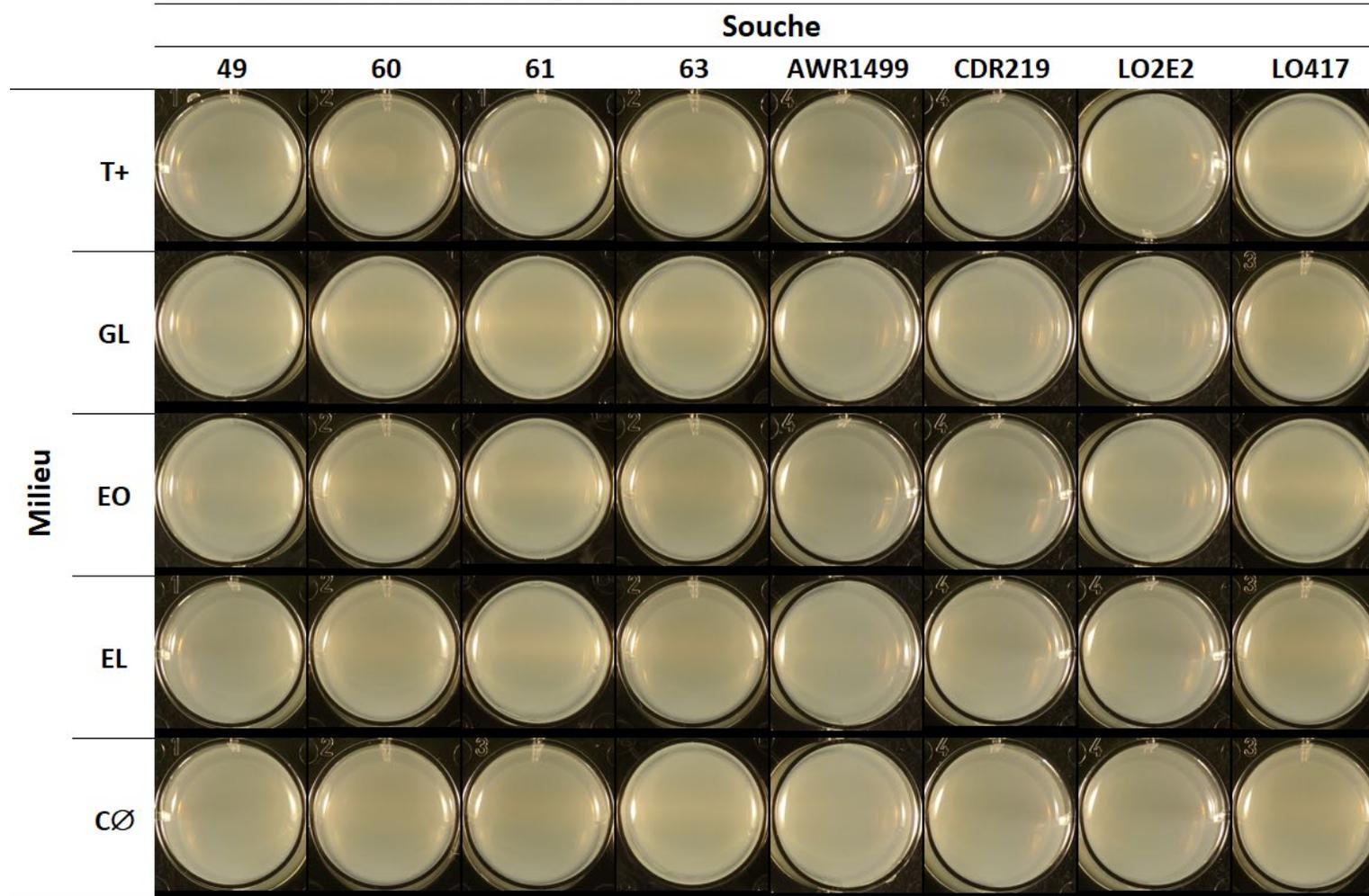
Anaérobiose - Invasion de la gélose

Figure 2.S2 (Suite). Photos des cultures de seize souches de *Brettanomyces bruxellensis* sur différents milieux gélosés variables en source de carbone après lavage (Invasion de la gélose) après 7 jours d'incubation en aérobiose ou anaérobiose. T+ : milieu complet ; GL : glucose limité ; EO : éthanol optimal ; EL : éthanol limité ; CØ : sans glucose ni éthanol.

Nombre total de puits analysés = 612

		Analyse visuelle	
		Non visible à l'œil (Classe 0)	Visible à l'œil (Classes 1, 2, 3)
Analyse informatique	Non détecté par l'algorithme	495	2
	Détecté par l'algorithme	6	109

Figure 2.S3. Comparaison de la détection de l'invasion par analyse visuelle (à l'œil) et par analyse informatique (détection par l'algorithme de traitement d'images).

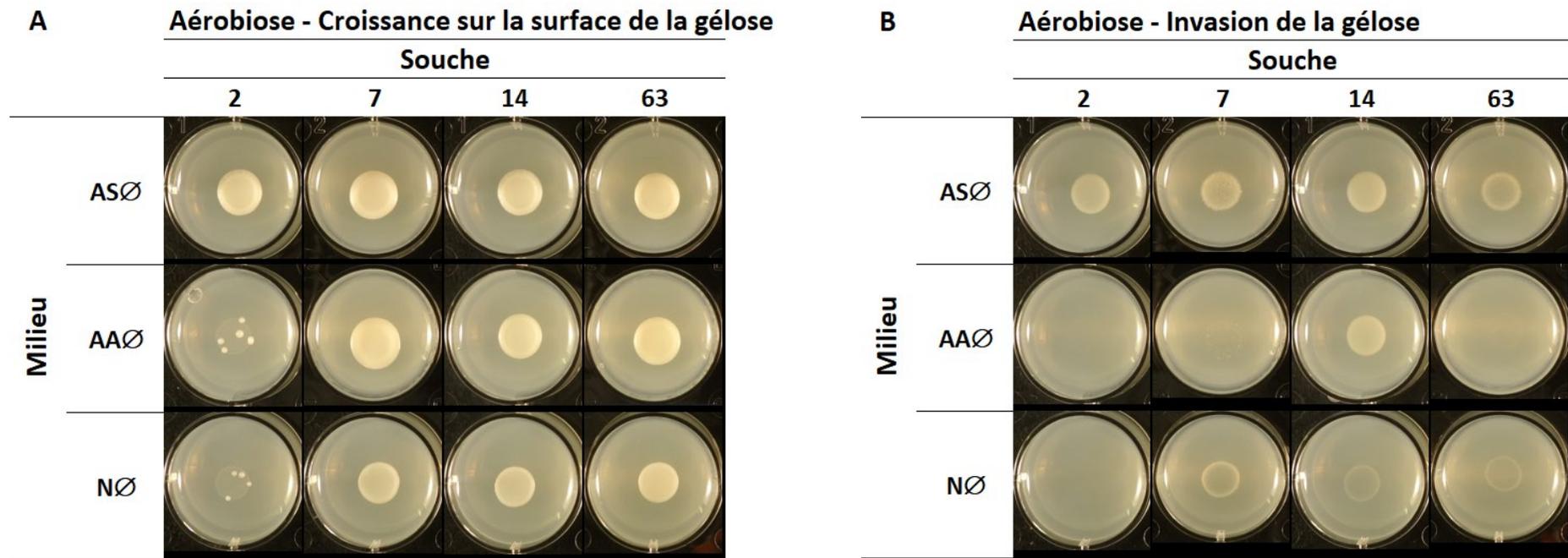


Figure 2.S4. Photos des cultures de 4 souches de *Brettanomyces bruxellensis* sur différents milieux gélosés variables en source d'azote (A) avant lavage (Croissance sur la surface de la gélose) et (B) après lavage (Invasion de la gélose) après 7 jours d'incubation en aérobiose. AAØ : sans acides aminés ; ASØ : sans sulfate d'ammonium ; NØ : sans acides aminés ni sulfate d'ammonium.

Tableau 2.S1. Evaluation de la croissance de seize souches de *Brettanomyces bruxellensis* sur des milieux gélosés contenant différentes sources de carbone en anaérobiose. Pour chaque condition, une classe a été attribuée selon le classification visuelle établie en Figure 2.3. T+ : milieu complet ; GL : glucose limité ; EO : éthanol optimal ; EL : éthanol limité ; CØ : sans glucose ni éthanol.

	Souche													AWRI 1499	CDR 219	LO2E2	LO417
	2	7	9	11	14	17	20	32	49	60	61	63					
T+	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
GL	2	1	1	2	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
Milieu EO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
EL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
CØ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Tableau 2.S2. Evaluation de la capacité d'invasion de seize souches de *Brettanomyces bruxellensis* à l'intérieur des milieux gélosés contenant différentes sources de carbone en aérobiose. Pour chaque condition, une classe a été attribuée selon la classification visuelle établie en Figure 2.4. Le signe * indique la classe majoritaire en cas d'hétérogénéité entre les 3 essais biologiques. T+ : milieu complet ; GL : glucose limité ; EO : éthanol optimal ; EL : éthanol limité ; CØ : sans glucose ni éthanol.

		Souche												AWRI 1499	CDR 219	LO2E2	LO417
		2	7	9	11	14	17	20	32	49	60	61	63				
Milieu	T+	3	2	2*	3	3	3	3	2	3	2	0*	2	1	0	3	1
	GL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1*
	EO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	EL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CØ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Chapitre 3

Diversité intraspécifique chez
Brettanomyces bruxellensis :
morphologie et profil génétique

Contexte scientifique

Dans ce projet de thèse, des différences phénotypiques sont apparues entre les souches de *Brettanomyces bruxellensis* étudiées (capacité d'adhésion, croissance en biofilm, morphologie cellulaire, capacité d'invasion). Cette levure d'altération est connue et décrite dans la littérature pour présenter une grande diversité phénotypique entre les souches, comprenant la production de phénols volatils et de nombreuses capacités de résistances aux stress (Capozzi *et al.*, 2016; Chatonnet *et al.*, 1992; Conterno *et al.*, 2006; Smith and Divol, 2016; Vigentini *et al.*, 2008). Ainsi, disposer d'outils simples, accessibles et fiables de discrimination au niveau intraspécifique pourrait potentiellement permettre de prédire le phénotype d'une souche donnée. Récemment, une forte corrélation a été révélée entre la résistance/tolérance au SO₂ et l'appartenance des souches de *B. bruxellensis* à un groupe génétique discriminé par analyse microsatellite (Avramova *et al.*, 2018b), permettant l'utilisation de cette méthode pour prédire le risque de résistance au SO₂.

Dans ce chapitre présenté sous forme d'un article scientifique, nous avons adapté un protocole de RAPD-PCR pour étudier la diversité intraspécifique de 74 isolats appartenant à 4 groupes génétiques afin de mettre au point une méthode moléculaire simple et accessible de discrimination du groupe génétique. De plus, dans le premier chapitre, nous avons mis en évidence des morphologies cellulaires différentes selon les souches étudiées, et suggéré un lien entre la forme des cellules levures et le groupe génétique auquel les souches appartenaient. Dans ce chapitre, cette analyse a été approfondie avec un nombre conséquent d'isolats afin de valider ce lien et simplifier davantage la discrimination intraspécifique en se basant sur la morphologie des cellules et non sur la différenciation génétique. Pour répondre à cet objectif, il a été décidé d'utiliser une méthode de « deep learning ». En effet, certaines méthodes de « deep learning », comme les réseaux de neurones convolutifs (CNN), ont été développées pour classer les images en catégories définies en exploitant l'ensemble des données disponibles dans l'image (Alzubaidi *et al.*, 2020; Jones *et al.*, 2017; Moen *et al.*, 2019). Par conséquent, un CNN a été entraîné dans cette étude à partir de nombreuses images de microscopie afin de prédire le groupe génétique d'un isolat à partir d'une simple observation microscopique.

Prediction of genetic groups within *Brettanomyces bruxellensis* through cell morphology using a deep learning tool

Article



Journal of
Fungi

an Open Access Journal by MDPI



Prediction of Genetic Groups within *Brettanomyces bruxellensis* through Cell Morphology Using a Deep Learning Tool

Manon Lebleux; Emmanuel Denimal; Déborah De Oliveira; Ambroise Marin; Nicolas Desroche; Hervé Alexandre; Stéphanie Weidmann; Sandrine Rousseaux

J. Fungi 2021, Volume 7, Issue 8, 581

Received: 28 June 2021; Accepted: 18 July 2021; Published: 21 July 2021

DOI: 10.3390/jof7080581

Manon Lebleux^{1,*}, **Emmanuel Denimal**², **Déborah De Oliveira**¹, **Ambroise Marin**³, **Nicolas Desroche**⁴, **Hervé Alexandre**¹, **Stéphanie Weidmann**¹ and **Sandrine Rousseaux**¹

¹ Laboratoire VALMiS-IUVV, AgroSup Dijon, UMR PAM A 02.102, University Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

² AgroSup Dijon, Direction Scientifique, Appui à la Recherche, 26 Boulevard Docteur Petitjean, F-21000 Dijon, France

³ Plateau D'imagerie DimaCell, Esplanade Erasme, Agrosup Dijon, UMR PAM A 02.102, University Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

⁴ Nexidia S.A.S., 15 Rue de Mayence, 21000 Dijon, France

* Corresponding author

Abstract: *Brettanomyces bruxellensis* is described as a wine spoilage yeast with many mainly strain-dependent genetic characteristics, bestowing tolerance against environmental stresses and persistence during the winemaking process. Thus, it is essential to discriminate *B. bruxellensis* isolates at the strain level in order to predict their stress resistance capacities. Few predictive tools are available to reveal intraspecific diversity within *B. bruxellensis* species; also, they require expertise and can be expensive. In this study, a Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) adapted PCR method was used with three different primers to discriminate 74 different *B. bruxellensis* isolates. High correlation between the results of this method using the primer OPA-09 and those of a previous microsatellite analysis was obtained, allowing us to cluster the isolates among four genetic groups more quickly and cheaply than microsatellite analysis. To make analysis even faster, we further investigated the correlation suggested in a previous study between genetic groups and cell polymorphism using the analysis of optical microscopy images via deep learning. A Convolutional Neural Network (CNN) was trained to predict the genetic group of *B. bruxellensis* isolates with 96.6% accuracy. These methods make intraspecific discrimination among *B. bruxellensis* species faster, simpler and less costly. These results open up very promising new perspectives in oenology for the study of microbial ecosystems.

Keywords: *Brettanomyces bruxellensis*; Morphology; Genetic groups; Deep learning; RAPD-PCR

1. Introduction

The spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* presents many strain-dependent characteristics, such as volatile phenol production that contributes to the famous “Brett character” [1–3], or capacities to withstand many stresses associated with wine related environments (nutritional requirements, resistance to low pH values, capacity to enter in Viable But Not Culturable state and SO₂ resistance) [4–8]. In addition to this ability of *B. bruxellensis* to persist in wine [7,9–11] and in cellars [12,13], the evolution of oenological practices, such as reducing oenological inputs (like lower SO₂ doses) and the impact of climate change on the physicochemical characteristics of wines (like higher pH levels), make the control of *B. bruxellensis* more challenging [14,15] and, therefore, leads to serious financial losses for winemakers [16]. Consequently, it is important to develop tools to further discriminate from the species level toward the strain level, and therefore, potentially, to predict spoilage-related phenotypes.

A large number of methods have been developed to discriminate yeasts at the strain level, but few studies have investigated intraspecific diversity among the species *B. bruxellensis*, mostly by distinguishing groups of strains. All of the studies described molecular methods, except one, which used Fourier Transform Infrared Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) spectroscopy to analyze the molecular composition of cells with mid-infrared radiation for *B. bruxellensis* strain discrimination. Despite being rapid and not requiring DNA extraction, this method cannot be applied routinely due to the need to standardize the protocol and access a database specific to the target microorganism [17].

Besides, molecular methods need a DNA extraction step and some of them used restriction enzymes like the Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism (mtDNA RFLP) method [18–20] and the Restriction Endonuclease Analysis Pulse Field Gel Electrophoresis (REA-PFGE) method [21]. Then, methods combining the use of restriction enzymes and Polymerase Chain Reaction (PCR) allowed for the increase in discriminating power of the analysis, such as Amplified Fragment-Length Polymorphism (AFLP) amplification [22,23] and the Sau-PCR method [21,24,25]. However, these methods that use restriction enzymes are quite laborious and can be difficult to interpret due to artifacts in electrophoresis [18].

Then, the methods that followed were based only on PCR. One of them was the Intron Splice Site PCR (ISS-PCR) method [18,26,27]. Recently, microsatellite analysis was applied for intraspecific discrimination among *B. bruxellensis* species [21,28]. This technique became a highly discriminating, robust and reproducible method adapted to the study of large populations, discriminating strains in different genetic groups and providing information in particular about their ploidy state and SO₂ resistance [5,12,29,30]. Thus, the determination of the genetic group of a given isolate could allow for predicting the risk of SO₂ resistance and, thus, help winemakers to adapt their antimicrobial techniques [5]. In addition, a diagnostic tool, TYPEBrett (ISVV-Microflora patent PCT/FR2016/052701) based on the microsatellite technique was developed and patented. Another PCR-based technique was the Random Amplified Polymorphism DNA PCR (RAPD-PCR) method. This method was most widely used to study

intraspecific diversity among *B. bruxellensis* species, even if it could sometimes be combined with other methods to improve discrimination [19,21,31–37]. The first use of RAPD-PCR provided poor discrimination of wine isolates from reference strains [31], but the method was improved by combining the individual profiles of each primer to assign composite profiles to each strain, making it more discriminating [19]. However, RAPD-PCR has sometimes been described as poorly reproducible and less efficient than other methods, but these problems could be minimized by standardizing the protocol [21,38]. Therefore, the RAPD-PCR method presents many advantages such as low cost, ease of use and analysis [39] to reveal intraspecific diversity within *B. bruxellensis* species, even if molecular methods require advanced skills and specialized equipment.

Another direction could be explored in order to further simplify discrimination. A previous work described different cell morphologies depending on the strain, and suggested a link between the variability in yeast cell shapes and the genetic group to which they belong [11]. To validate this suggested link, extensive analyses through larger microscopic observations with a consequent number of isolates should be conducted. In this context, the use of tools such as those provided by deep learning methods appears obvious. Deep learning algorithms have been developed to classify images into defined categories by exploiting available features they contain [40,41]. In recent years, such algorithms have been applied to images in various biological fields and have transformed the analysis and interpretation of imaging data. For example, deep learning tools have been used to discriminate foodborne pathogens [42], to aid in sickle cell anemia diagnosis [43] and to predict mechanisms of drug resistance of cancer cells [44]. The aim of the present work is to provide rapid, easy-to-use and inexpensive tools for routine intraspecific discrimination. First, a RAPD-PCR protocol was adapted to study intraspecific diversity among 74 isolates belonging to four genetic groups, and provides a baseline for classifying these isolates using a simple and accessible molecular technique. Simultaneously, a pre-trained Convolutional Neural Network (CNN) was fitted to predict the genetic group of isolates tested based on differences in cell morphology.

2. Materials and methods

2.1. Yeast isolates and strains

This study included a total of 74 isolates previously identified as *B. bruxellensis* and discriminated in four different genetic groups (GG1, GG2, GG3 and GG4) by microsatellite analysis (**Table 3.1**): (i) 10 strains of *B. bruxellensis* from collections (AWRI1499, CDR3, CDR9, CDR11, CDR12, CDR217, CDR219, LO2E2, LO417, LO6/036) [29], and (ii) 64 isolates obtained from enological materials and/or wine from wineries (named from 1 to 64) [11]. The yeasts were stored at -80 °C in YPD liquid medium (0.5% w/v yeast extract (Biokar, Beauvais, France), 1% w/v bactopectone (Biokar), 2% w/v D-glucose (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) and 0.02% w/v chloramphenicol (Sigma, St Louis, MI, USA), containing 20% v/v glycerol.

Table 3.1. List of isolates and strains used in this study.

Isolate/Strain of Reference	Genetic Group (GG)
1, 14, 25, 26, 27, 30, 49, 61, 62, LO2E2, CDR3, CDR12	GG1
2, 4, 6, 11, 17, 19, 20	GG2
3, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 21, 22, 23, 24, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 64, LO6/036, CDR9, CDR11	GG3
63, CDR217, CDR219, LO417, AWRI1499	GG4

AWRI: Australian Wine Research Institute, Australia; CDR: Côtes du Rhône, Inter Rhône, France.

2.2. Genetic analysis

2.2.1. DNA extraction

Using stock-cultures stored at -80°C , cultures were prepared in YPD medium at 28°C . After growth until the stationary phase, cells were harvested by centrifugation ($9150\times g$ for 4 min at 4°C), washed with 1 mL of sterile water and then re-suspended in 200 μL of extraction buffer (SDS 1% w/v, Triton $\times 100$ 2% w/v, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH = 8), with 0.3 g glass beads (0.5 mm in diameter; Scientific Industries) and 60 μL phenol:chloroform:isoamyl alcohol 25:24:1 (Sigma). The cells were broken for 3×45 s at 6500 rpm with a 60-s interval using a Precellys 24-Dual Homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). After the addition of 200 μL of Tris EDTA buffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), the cultures were centrifuged at $18,200\times g$ for 10 min at 4°C . The aqueous phase was collected and the DNA was precipitated with 1 mL of 100% ethanol and then centrifuged at $18,200\times g$ for 10 min at 20°C . The pellet was washed with 70% ethanol and centrifuged at $18,200\times g$ for 5 min at 20°C . Then, the pellet was dried and resuspended in sterile water. Finally, the samples were stored at -20°C . The concentration and purity of DNA was measured by Infinite M200 Pro NanoQuant (TECAN, Lyon, France).

2.2.2. RAPD-PCR

RAPD profiles were obtained using 3 primers, OPA-02 (5'-TGC CGA GCT G-3'), OPA-03 (5'- AGT CAG CCA G-3') and OPA-09 (5'-GGG TAA CGC C-3') (Eurogentec, Seraing, Belgium), as previously described [19,21,31,33]. PCR reactions were performed in 40 μL reactions containing 50 ng of DNA, Go Taq Buffer 1.25 \times , 1.875 mM MgCl_2 , 2 μM of primer (1 primer per PCR reaction), 0.25 mM of each dNTP and 2.5 U of Go Taq polymerase (Go Taq[®] Flexi DNA Polymerase, Promega, Madison, WI, USA). The amplification reactions were carried out in a thermocycler BioRAD T100[™] (BioRAD, Marnes-la-Coquette, France) under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 36°C for 1 min, 72°C for 2 min and a final extension at 72°C for 10 min [19,33]. The reaction products were analyzed by capillary electrophoresis using MultiNA (MCE-202/MultiNA, Shimadzu Biotech, Marne la Vallée, France) and the DNA-2500 Reagent Kit (Shimadzu Corporation, Marne la Vallée, France) with pGEM[®] DNA Markers (Promega, Madison, USA) as ladder.

2.3. Cell polymorphism analysis

2.3.1. Cultures

Isolates were grown on YPD plates (YPD broth with 2% w/v agar) at 28 °C from the stock at –80 °C. From each YPD plate, one isolated colony was inoculated in 15 mL of YPD and the liquid cultures were incubated at 28 °C for 72 h.

2.3.2. Microscopic observations

For each culture, 6 µL was placed between the slide and coverslip, and optical microscopic transmitted light observations were performed. Images were scanned at 1280 × 960 pixels, 8-bit gray scale, at ×40 magnification and 38% brightness using the EVOS® FL Imaging System (Invitrogen, Bothell, WA, USA).

Two data sets were built.

Dataset1 was composed of 10 images per culture and 3 independent cultures for each of the 74 isolates. Six images of isolate 30 and one of isolate 56 were rejected due to artifacts. The distribution of images among genetic groups was the following: 354 images for GG1, 210 for GG2, 1499 for GG3 and 150 for GG4.

Dataset2 consisted of 233 images, with 46 images for GG1 (10 images for 1 culture of isolate 14; 17 images for 2 cultures of isolate 49; 19 images for 2 cultures strain LO2E2), 63 images for GG2 (10 images for 1 culture of isolate 2; 18 images for 2 cultures of isolate 11; 18 images for 2 cultures of isolate 17; 17 images for 2 cultures of isolate 20), 66 images for GG3 (10 images for 1 culture of isolate 7; 19 images for 2 cultures of isolate 9; 18 images for 2 cultures of isolate 32; 19 images for 2 cultures of isolate 60) and 58 images for GG4 (10 images for 1 culture of isolate 63; 16 images for 2 cultures of strain CDR219; 16 images for 2 cultures of strain LO417; 16 images for 2 cultures of strain AWRI1499).

2.3.3. Cell shape determination

From dataset1, one representative (without artifact, similar cell density) image per biological replicate was selected, amounting to 3 images per isolate. A total of 100 cells were pseudo-randomly selected (excluding buds) from these 3 images. Then, ImageJ software (1.52i) was used to measure cell morphology characteristics as described in a previous study [11]. Briefly, the length to width (l/w) ratio and the cell area were determined from the measurement of 100 single cells per isolate, amounting to 7400 cells.

2.3.4. Deep learning

The pre-trained Convolutional Neural Network GoogleNet was chosen. This CNN was trained with over 1 million images classified into 1000 object categories. This network thus learned rich feature representations for a wide range of images. It had to be adapted by transfer learning to specialize it for the discrimination of genetic groups. Hence, the end of the CNN was customized to output 4 categories, corresponding to the 4 genetic groups instead of the 1000 initial object categories. Then, the learning rate weight of the last layers was set to 5 to accentuate the learning rate. On the contrary, the learning rate weight of the 10 first layers was frozen in order to keep the advantage of

the previous training.

Firstly, dataset1 was used to train the CNN. To fit the input requirement of the network and increase the number of learning cases, the microscopic images were divided into subpictures (**Figure 3.1**). To do this, each image from dataset1 was divided into multiple thumbnail images of 224×224 pixels, corresponding to the input size of the pre-trained CNN. Several thousand thumbnails were generated in this way. To balance the sets for each genetic group, the same number (3000) of randomly selected thumbnails were used, corresponding to the number of elements in the smallest genetic group (GG4). This 4×3000 thumbnail dataset was then randomly divided into two subsets: (i) 75% used for CNN training (training dataset), and (ii) 25% used for training performance validation (validation dataset) and the calculation of the confusion matrix.

Due to the low number of images available, data augmentation was performed to increase the amount of training data. The augmentation process was achieved by applying several random transformations from original images consisting of rotations (-45° , $+45^\circ$), horizontal and vertical mirrors and x -, y -axis translations (-30 pixels, $+30$ pixels). The training was performed on 64 epochs using a Nvidia GTX1080 GPU.

Secondly, dataset2 was used to test the accuracy of the trained model. For each of the 233 images to be classified, the same thumbnailing process as for the dataset1 was applied. Then, each thumbnail of the image to be labeled was presented to the CNN, which associated it with one genetic group. The genetic group that was most frequently assigned among the thumbnails was then assigned to the image.

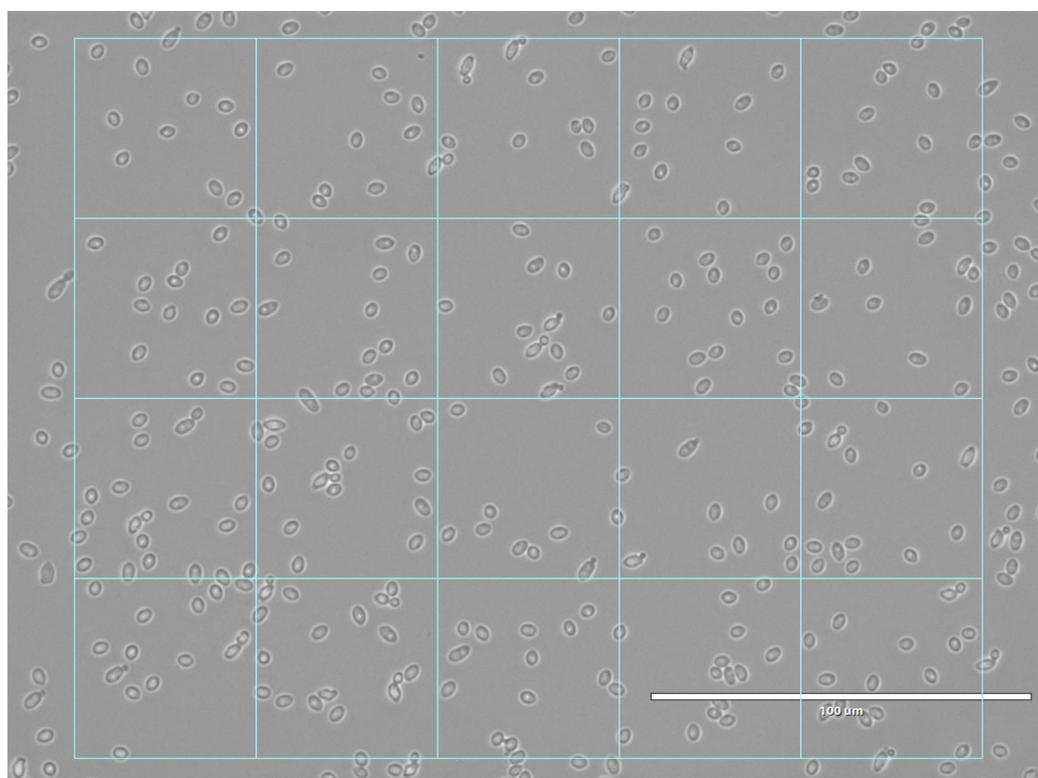


Figure 3.1. Typical microscopic image divided into thumbnails.

3. Results and Discussion

3.1. Intraspecific discrimination of the *B. bruxellensis* isolates into genetic groups

RAPD-PCR was adapted here to assess its discriminating power and provide an accessible protocol to determine the genetic group of *B. bruxellensis* isolates. RAPD-PCR assay was performed on 74 *B. bruxellensis* isolates with 3 different primers among those most used in the literature: OPA-02, OPA-03 and OPA-09 [19,21,31,33]. The analysis led to obtaining 4 profiles for OPA-02 (A2 to D2) and OPA-03 (A3 to D3), and 5 profiles for OPA-09 (A9 to F9) (**Figure 3.2**), making OPA-09 the most discriminating primer compared to the other two primers, in accordance with previous studies [19,31]. The reproducibility of the RAPD-PCR method adapted in this study was checked (**Supplementary Data, Figure 3.S1**).

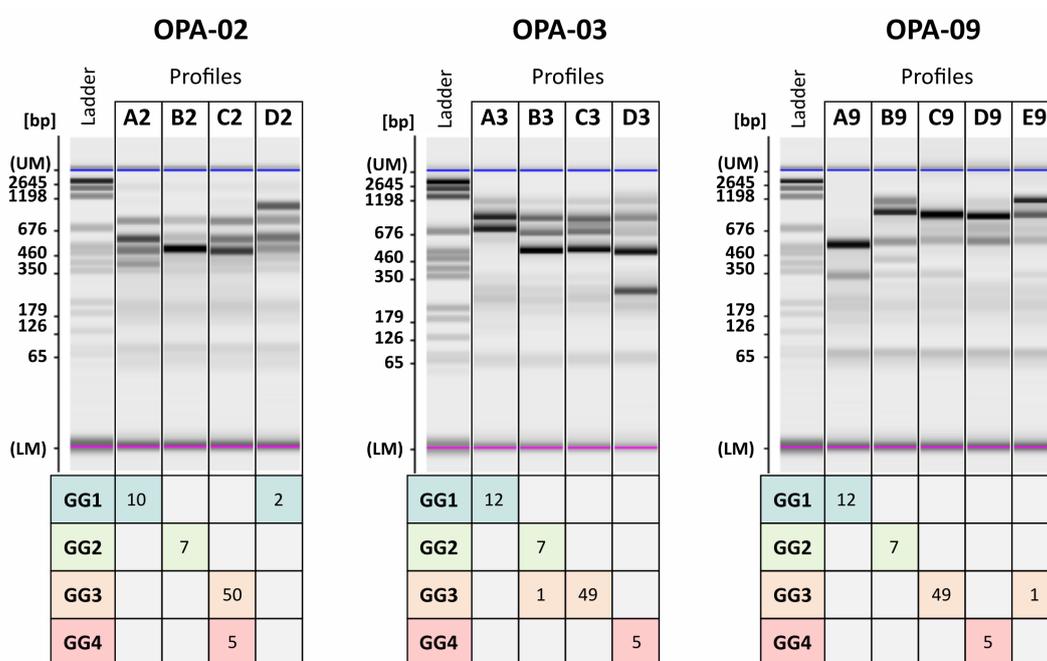


Figure 3.2. Random Amplified Polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR) profiles obtained with each primer, OPA-02, OPA-03 and OPA-09, for 74 isolates of *Brettanomyces bruxellensis*. Profiles are indicated by different letters for each primer. Genetic groups are indicated on the left and by different color. At the intersection of a row (genetic group) and a column (RAPD-PCR profile) is the number of isolates corresponding to a given combination of a genetic group and a RAPD-PCR profile. Ladder: pGEM® DNA Markers.

The ability to predict a *B. bruxellensis* isolate's adaptability to given environmental factors, such as SO₂ resistance, was demonstrated by determining a genetic group of isolates using microsatellite genotyping [5]. In this work, we investigated whether the RAPD-PCR adapted method could assign genetic groups in the same way as microsatellite genotyping. This was done with the aim of proposing a routine method to potentially predict SO₂ resistance. Therefore, the intraspecific diversity obtained by RAPD-PCR was compared to the discrimination in genetic groups by microsatellite analysis (**Figure 3.2**). Whatever the primer used, high correlation was obtained

between genetic groups and RAPD-PCR profiles. Nevertheless, primer OPA-02 did not discriminate between GG3 and GG4, which shared the same profile C2. Similarly for primer OPA-03, GG2 and GG3 shared the same profile B3. The best correlation was obtained with primer OPA-09 since each profile corresponded to a unique GG: profile A9 to GG1, B9 to GG2 and D9 to GG4. GG3 was divided into 2 profiles, C9 and E9. Thus, RAPD-PCR was suitable for discriminating the 74 isolates of *B. bruxellensis* in the same distribution as microsatellite analysis within genetic groups described [11,29]. This RAPD-PCR protocol could be applied to provide a simple and rapid molecular means of determining the genetic group of a *B. bruxellensis* isolate, and thus, a prediction of its phenotype since the identification of the genetic group of a given isolate provides information about its SO₂ resistance [5].

3.2. From cell polymorphism to genetic groups

3.2.1. Qualitative and quantitative description of cell morphology

In the literature, microscopic observations of *B. bruxellensis* strains show a high level of cell polymorphism. Up to now, the majority of the studies reporting polymorphism in *B. bruxellensis* have focused on its ability to form filaments, described as a survival mechanism [45]. Thus, the description of polymorphism as strain dependent mainly focused on filaments [46–49] at the expense of yeast cells, which display highly diverse morphology and are not sufficiently exploited. Indeed, correlating the diversity of yeast cell morphology to an intraspecific genetic diversity is difficult due to the limited data available, making it difficult to compare the results of the different studies (few or no microscopic observations available, heterogeneous images, different culture conditions). Nevertheless, a previous study suggested that the variability of the yeast cell shapes may be linked to intraspecific diversity within *B. bruxellensis* species. Indeed, microscopic observations of 12 strains of *B. bruxellensis* revealed different cell shapes depending on the strain, and that this shape variability was linked to the genetic group of the strains [11]. Thus, this phenotypic characteristic could be a tool for discriminating isolates.

In this work, 74 isolates of *B. bruxellensis* were observed by transmitted light optical microscopy, highlighting different cell features. First, several distinctive cell shapes appeared according to the strain: elongated cells (**Figure 3.3A**), small cells (**Figure 3.3B**) and round cells (**Figure 3.3C**). No influence of growth stage, culture conditions and lifestyle on cell morphology was noticed (data not shown), confirming previous studies [11,46]. These various shapes were consistent with previous studies, each of which described a range of cell shapes such as round, elongated, ovoid, carrot-shaped and ellipsoidal [11,33,46–48,50,51]. In addition, strains belonging to GG4 presented the characteristic of forming multicellular structures (aggregation of independent cells or non-separation of daughter cells) (**Figure 3.3D**), which cannot be described through individual cell shape. Strains belonging to the other 3 genetic groups only rarely displayed these multicellular structures. This feature has rarely been described in *B. bruxellensis* species [46,51].

Then, to further investigate the link between yeast cell morphology and genetic groups, it was necessary to compare a large number of cells and rely on quantitative

data. Thus, the qualitative feature “shape” was transposed into a quantitative variable by plotting the cell area versus the l/w ratio (**Figure 3.3E**). The shapes of 100 cells for each of the 74 isolates, totaling 7400 cells, from dataset1 were assessed: the higher the ratio, the more elongated the cells and the higher the area value, the bigger the cells. The wide distribution of the points highlighted highly diverse cell morphology in the species *B. bruxellensis*.

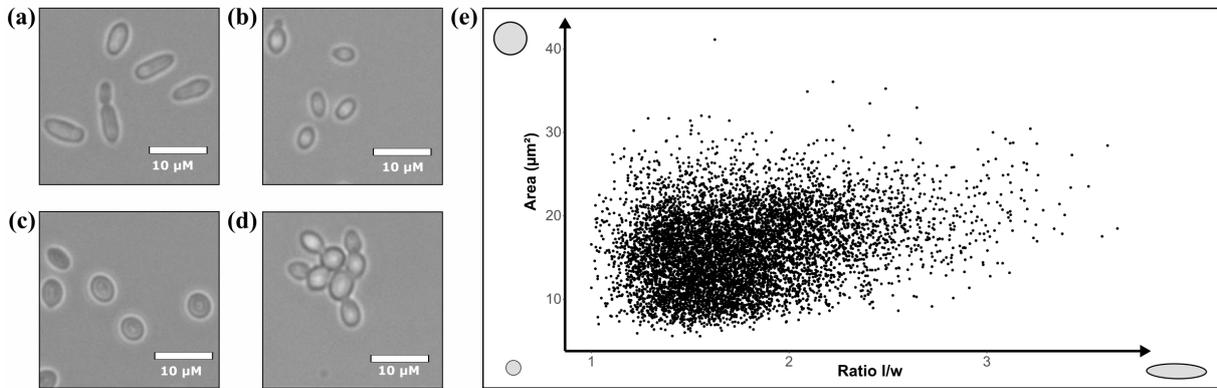


Figure 3.3. Polymorphism of yeast cells among 74 *Brettanomyces bruxellensis* isolates: (A) elongated cells, (B) small cells, (C) round cells and (D) presence of multicellular structure. (E) Distribution of 7400 cells of *B. bruxellensis* (100 cells per strain) according to length to width (l/w) ratio and area measurements.

To investigate this distribution further, density curves were plotted according to the area on the right and to the l/w ratio on the top, to show the distribution of the cells inside each genetic group (**Figure 3.4**). GG1 and GG4 presented a low average l/w ratio (1.50), corresponding to rounder cells. However, GG1 presented a lower average area ($13.9 \mu\text{m}^2$) than GG4 ($18.5 \mu\text{m}^2$). GG2 and GG3 presented higher average l/w ratios (1.72 and 1.84, respectively), corresponding to more elongated cells. Moreover, these groups could be discriminated by their average area, $11.5 \mu\text{m}^2$ for GG2 corresponding to small cells, compared to $16.9 \mu\text{m}^2$ for GG3. Differences appeared between genetic groups, but considering the spread of the curves, overlaps suggested similarities in cell morphology between genetic groups. In particular, the curves corresponding to GG3 had a large amplitude. As such, to refine the discrimination according to cell morphology, it would be relevant to explore it at the isolate level. Therefore, the average l/w ratio and the average area of 100 cells were determined for each isolate. The 2D spatial representation of these averages specified the clusters according to genetic groups (**Figure 3.4**). GG2 was clearly separated from GG3 and GG4, while close to some isolates of GG1. The large majority of GG3, corresponding to elongated cells, was also clearly separated. However, it should be noted that some isolates belonging to GG3 had a lower l/w ratio and were mixed with several GG1 and GG4 isolates. These latter isolates, from GG4, were also grouped together. Despite some minor confusions between the different groups, it is clear that, in the culture conditions of this study, the polymorphism of the cells was related to genetic groups.

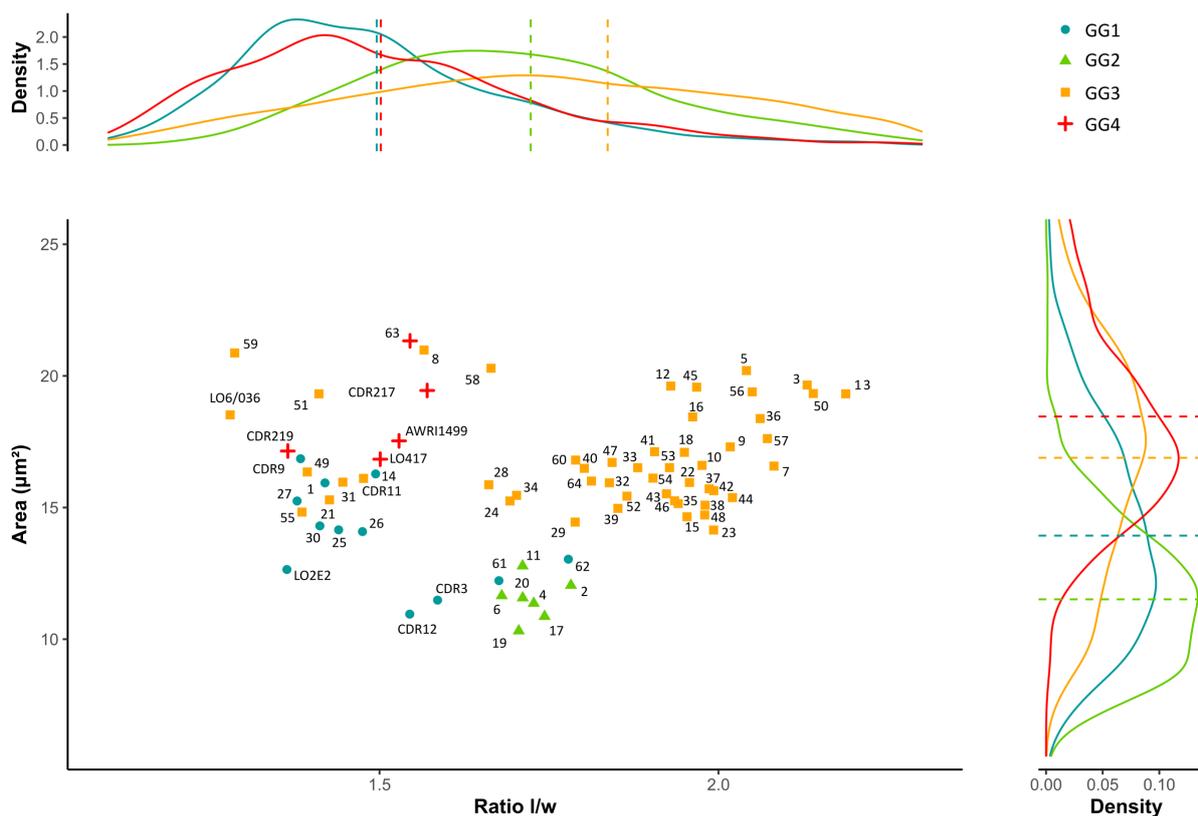


Figure 3.4. Distribution of 74 isolates of *Brettanomyces bruxellensis* according to average length to width (l/w) ratio and average area measurements. For each genetic group, the density curves for the l/w ratio (on the top) and for the area (on the right) were assigned with the mean (dashed line). Each genetic group is represented by a different color: GG1 (blue), GG2 (green), GG3 (orange) and GG4 (red).

Nevertheless, this manual treatment of the images quickly limited the analysis since it was time consuming, quite subjective and it took account of only two cell shape attributes, leaving out the distinctive feature of GG4 to form multicellular structures although it could be a key point for genetic group discrimination. Thus, in order to analyze all cell and population features available through microscopic images rapidly and reproducibly, a more robust method such as deep learning could be applied. Indeed, algorithms for deep learning, such as convolutional neural networks, allow image classifying into defined categories by exploitation of all the features available in raw images (even the subtlest ones) and automatic learning [40,41].

3.2.2. Use of deep learning to predict the genetic group of *B. bruxellensis* isolates

For the present study, the use of a CNN allows us to change the focus from studying single cells to that of the general aspect of the population. Indeed, although the different classes share common shapes, the algorithm ought to separate them according to their differences, and thus, the majority shapes and behaviors.

To exploit intra- and inter-genetic group variability more efficiently, the CNN GoogleNet was used and trained to classify microscopic images in the 4 genetic groups. The detailed performance analysis is shown in **Table 3.2**. The model successfully

predicted the genetic group of the image 90.8% of the time, with an F1-score of 0.9076. The model was 91.05% reliable when assigning a genetic group to an image. These results indicated that the model was able to predict the genetic group of an isolate from a simple microscopic observation more than 9 times out of 10.

Table 3.2. Performance of the Convolutional Neural Network (CNN) GoogleNet trained and validated with dataset1 to classify genetic groups from microscopic images.

Accuracy	Error	Sensitivity	Specificity	Precision	FalsePositive Rate	F1-Score
0.9080	0.0920	0.9080	0.9693	0.9105	0.0307	0.9076

Results of classification for dataset validation (from dataset1) are presented in the confusion matrix (**Figure 3.5**). The diagonal represented the correctly predicted number of each observation. The precision (bottom) and the sensitivity (right column) were calculated for each class. Each genetic group was predicted at 90.3%, 81.7%, 92.5% and 98.7% for GG1, GG2, GG3 and GG4, respectively. Moreover, the model reached a high prediction reliability of 86.0%, 94.6%, 86.5% and 96.7% for GG1, GG2, GG3 and GG4, respectively. The minor confusions between genetic groups could be explained by the characteristics they share, like GG1 and some GG3 isolates clustered together due to a low l/w ratio in **Figure 3.4**. In addition, GG4 was the best predicted class probably due to the behavior characteristic of this genetic group, which tends to form multicellular structures and is, therefore, easy to discriminate (**Figure 3.3D**). The classification results indicated the model clearly learnt to classify images based on cell morphological and population features.

		Predicted class					
		GG1	GG2	GG3	GG4		
True class	GG1	677	25	40	8	90.3%	9.7%
	GG2	73	613	61	3	81.7%	18.3%
	GG3	34	8	694	14	92.5%	7.5%
	GG4	3	0	7	740	98.7%	1.3%
		86.0%	94.6%	86.5%	96.7%		
		14.0%	5.1%	13.5%	3.3%		

Figure 3.5. Confusion matrix for the classification of 4 genetic groups from dataset1.

To test the “real-world” performance of the model, classification was performed on dataset2. With these microscopic images, the model achieved an accuracy of 96.6%, confirming its outstanding predictive power. Thus, this deep learning method stands as a prime method for the study of microbial intraspecific discrimination. Indeed, from a

simple microscopic observation of a culture of *B. bruxellensis*, it is possible to predict the genetic group of the isolate studied with fairly high confidence. The prediction of the CNN might achieve greater accuracy by including more strains, since the larger and more representative the training database, the better the performances of the CNN. The CNN trained in this study provides a very fast initial result, which can be used as is. Nevertheless, if a higher level of confidence is required, it can be achieved with the RAPD-PCR protocol. This allows confirmation at the genetic level of the pre-determination in silico of the genetic group. The complementarity of both methods makes intraspecific discrimination within *B. bruxellensis* species efficient, rapid, simple and inexpensive.

3.2.3. Does the link between genetic groups and cell morphologies predict any specific functions?

The existence of a link between cell polymorphism and genetic groups in the *B. bruxellensis* species indicates that shape variation is probably linked to clusters of genes encoding for various functions, which could be related to adaptation to environmental factors, for example.

In a study investigating the phenotype of a nearly complete collection of gene-deletion mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [52], 673 strains exhibited slight to strong morphological alterations compared to a wild-type strain, allowing the identification of genes involved in specifying cell shape and size. In particular, clumped and elongated strains were enriched for mutations in genes for cell growth, cell division and DNA synthesis, whereas round strains were enriched for mutations in protein synthesis genes. Therefore, in the *B. bruxellensis* species, since the genetic groups gather strains with the same morphological typology, it is likely that strains from the same genetic group share similar mutation types.

In addition, microsatellite analysis revealed that strains of *B. bruxellensis* were structured in genetic groups according to ploidy level [29]. Thus, cell morphology may be related to ploidy level, especially as another morphological characteristic, filamentation, has been shown to be related to the ploidy of yeasts. Indeed, in *S. cerevisiae*, different triggers for pseudohyphae formation have been reported for diploid (nitrogen limitation) and haploid cells (glucose deprivation) [46,53–55].

Besides the shapes, one of the genetic groups was distinguishable by a multicellular phenotype. Such phenotypes, like flocs resulting from aggregation or clumps formed by incomplete separation, have been described in *S. cerevisiae* as protection mechanisms against environmental stresses [56–59]. In *B. bruxellensis*, it turns out that GG4, which presented this feature, is mainly composed of SO₂ resistant/tolerant strains [5]. Thus, these multicellular structures may be involved in the SO₂ resistance of the yeast.

4. Conclusions

In this study, the CNN GoogleNet was trained to provide rapid and highly reliable screening of genetic groups of *B. bruxellensis* isolates, since it was able to correctly predict the genetic group of an isolate from a simple microscopic observation with

96.6% accuracy. This CNN provides a rapid, simple and inexpensive tool for routine intraspecific discrimination in *B. bruxellensis* species. Pre-determination *in silico* of the genetic group of an isolate can be confirmed at the genetic level by the RAPD-PCR protocol, since the use of primer OPA-09 successfully discriminated *B. bruxellensis* isolates in the same distribution among genetic groups as microsatellite analysis, in a more accessible and less expensive manner.

The present study opens new perspectives for the use of deep learning methods in oenology to provide powerful, robust and timesaving analyses. The polymorphism of yeast cells among *B. bruxellensis* species clearly appears to be related to the genetic group of isolates. Therefore, assessing cell morphology could allow us to predict the genetic group of isolates, itself linked to their SO₂ resistance. The same intraspecific discrimination study could be considered for other yeast species using a CNN. Furthermore, discrimination could be extended at the interspecies level for the identification of unknown microorganisms. CNN could be used to pre-classify species of yeast or species of bacteria from routine microscopic observations performed after isolation to optimize subsequent molecular analyses. Moreover, this tool could be useful for implantation control and population monitoring during winemaking, providing real-time results simply by microscopic observation.

Supplementary Materials: The following are available online <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof7080581/s1>, Figure S1: Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR) adapted method. For each primer (OPA-02, OPA-03 and OPA-09), the profiles of 3 independent repetitions are provided for 3 different isolates. Ladder: pGEM® DNA Markers.

Author Contributions: Conceptualization, M.L., E.D., A.M., S.W., and S.R.; methodology, M.L., E.D., S.W., and S.R.; software, E.D., and A.M.; validation, M.L., E.D., H.A., S.W., and S.R.; formal analysis, data curation, writing—original draft preparation, visualization, M.L., and E.D.; investigation, M.L., E.D., and D.D.O.; resources, E.D., N.D., and H.A.; writing—review and editing, all authors; supervision, project administration, S.W., and S.R.; funding acquisition, H.A., and S.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Regional Council of Bourgogne-Franche-Comté, the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)” [CRB 2016-9201AAO048S01632] and the Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation.

Acknowledgments: The authors thank Vincent Gerbaux (from “Institut français de la vigne et du vin”) and Claudine Degueurce (from “InterRhône”) for providing strains for the study; Rémy Romanet and Florian Bahut for their help for the treatment of the data; and Vanessa David-Vaizant for her help with handling and maintaining the capillary electrophoresis.

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

5. References

- Chatonnet, P.; Dubourdie, D.; Boidron, J.; Pons, M. The Origin of Ethylphenols in Wines. *J. Sci. Food Agric.* 1992, *60*, 165–178, doi:10.1002/jsfa.2740600205.
- Wedral, D.; Shewfelt, R.; Frank, J. The Challenge of *Brettanomyces* in Wine. *LWT-Food Sci. Technol.* 2010, *43*, 1474–1479, doi:10.1016/j.lwt.2010.06.010.
- Fugelsang, K.C.; Zoecklein, B.W. Population Dynamics and Effects of *Brettanomyces bruxellensis* Strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 2003, *54*, 294–300.
- Smith, B.D.; Divol, B. *Brettanomyces bruxellensis*, A Survivalist Prepared for the Wine Apocalypse and Other Beverages. *Food Microbiol.* 2016, *59*, 161–175, doi:10.1016/j.fm.2016.06.008.
- Avramova, M.; Vallet-Courbin, A.; Maupeu, J.; Masneuf-Pomarede, I.; Albertin, W. Molecular Diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis*' Sulfur Dioxide Sensitivity through Genotype Specific Method. *Front. Microbiol.* 2018, *9*, 1260, doi:10.3389/fmicb.2018.01260.
- Conterno, L.; Joseph, C.M.L.; Arvik, T.J.; Henick-kling, T.; Bisson, L.F. Genetic and Physiological Characterization of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 2006, *57*, 139–147.
- Longin, C.; Degueurce, C.; Julliat, F.; Guilloux-Benatier, M.; Rousseaux, S.; Alexandre, H. Efficiency of Population-Dependent Sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red Wine. *Food Res. Int.* 2016, *89*, 620–630, doi:10.1016/j.foodres.2016.09.019.
- Serpaggi, V.; Remize, F.; Recorbet, G.; Gaudot-Dumas, E.; Sequeira-Le Grand, A.; Alexandre, H. Characterization of the “Viable but Nonculturable” (VBNC) State in the Wine Spoilage Yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiol.* 2012, *30*, 438–447, doi:10.1016/j.fm.2011.12.020.
- Rubio, P.; Garijo, P.; Santamaría, P.; López, R.; Martínez, J.; Gutierrez, A.R. Influence of oak Origin and ageing Conditions on wine Spoilage by *Brettanomyces* Yeasts. *Food Control* 2015, *54*, 176–180, doi:10.1016/j.foodcont.2015.01.034.
- Suárez, R.; Suárez-Lepe, J.A.; Morata, A.; Calderón, F. The Production of Ethylphenols in Wine by Yeasts of the Genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A Review. *Food Chem.* 2007, *102*, 10–21, doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.030.
- Lebleux, M.; Abdo, H.; Coelho, C.; Basmaciyan, L.; Albertin, W.; Maupeu, J.; Laurent, J.; Roullier-Gall, C.; Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M.; et al. New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm Mode of Life. *Int. J. Food Microbiol.* 2020, *318*, 108464, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464.
- Cibrario, A.; Avramova, M.; Dimopoulou, M.; Magani, M.; Miot-Sertier, C.; Mas, A.; Portillo, M.C.; Ballestra, P.; Albertin, W.; Masneuf-Pomarede, I.; et al. *Brettanomyces bruxellensis* wine Isolates Show High Geographical Dispersal and Long Persistence in Cellars. *PLoS ONE* 2019, *14*, e0222749, doi:10.1371/journal.pone.0222749.
- Cartwright, Z.M.; Glawe, D.A.; Edwards, C.G. Reduction of *Brettanomyces bruxellensis* Populations from oak Barrel Staves using Steam. *Am. J. Enol. Vitic.* 2018, *69*, 400–409, doi:10.5344/ajev.2018.18024.
- Escudier, J.L.; Bes, M.; Salmon, J.M.; Caillé, D.; Samson, A. Stress Hydrique Prolongé Des Vignes: Comment Adapter Les Pratiques Œnologiques en Conséquence ? *Innov. Agron.* 2014, *38*, 67–86.
- Van Leeuwen, C. L'augmentation du pH des Moûts et des Vins, un facteur Important de Développement de *Brettanomyces*. In Proceedings of the 13e matinée des Œnologues de Bordeaux, Université de Bordeaux, Bordeaux, France, 20 March 2015.
- Lathey, K.A.; Bramley, B.R.; Francis, I.L. Consumer acceptability, Sensory Properties and expert Quality Judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz Wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2010, *16*, 189–202, doi:10.1111/j.1755-0238.2009.00069.x.
- Oelofse, A.; Malherbe, S.; Pretorius, I.S.; Du Toit, M. Preliminary Evaluation of Infrared Spectroscopy for the Differentiation of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Red Wines. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, *143*, 136–142, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.004.
- Vigentini, I.; De Lorenzis, G.; Picozzi, C.; Imazio, S.; Merico, A.; Galafassi, S.; Piškur, J.; Foschino, R. Intraspecific Variations of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* genome Studied by capillary Electrophoresis Separation of the Intron Splice Site Profiles. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, *157*, 6–15, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.017.
- Martorell, P.; Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Fernández-Espinar, M.T.; Loureiro, V.; Querol, A. Molecular typing of the Yeast Species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* Recovered from Wine Related Sources. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, *106*, 79–84, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.014.
- Ibeas, J.I.; Lozano, I.; Perdígones, F.; Jimenez, J. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* Strains in Sherry by A Nested PCR Method. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, *62*, 998–1003.
- Miot-Sertier, C.; Lonvaud-Funel, A. Development of A Molecular Method for the Typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the Strain Level. *J. Appl. Microbiol.* 2007, *102*, 555–562, doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03069.x.
- Curtin, C.D.; Bellon, J.R.; Henschke, P.A.; Godden, P.W.; de Barros Lopes, M.A. Genetic Diversity of *Dekkera bruxellensis* Yeasts Isolated from Australian Wineries. *FEMS Yeast Res.* 2007, *7*, 471–481, doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00183.x.
- de Barros Lopes, M.; Rainieri, S.; Henschke, P.A.; Langridge, P. AFLP Fingerprinting for Analysis of Yeast Genetic Variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, *49*, 915–924, doi:10.1099/00207713-49-2-915.
- Campolongo, S.; Rantsiou, K.; Giordano, M.; Gerbi, V.; Cocolin, L. Prevalence and Biodiversity of *Brettanomyces bruxellensis* in Wine from Northwestern Italy. *Am. J. Enol. Vitic.* 2010, *61*, 486–491, doi:10.5344/ajev.2010.10034.
- Corich, V.; Mattiazzi, A.; Soldati, E.; Carraro, A.; Giacomini, A. Sau-PCR, A Novel Amplification Technique for Genetic Fingerprinting of Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, *71*, 6401–6406, doi:10.1128/AEM.71.10.6401-6406.2005.
- Vigentini, I.; Picozzi, C.; Foschino, R. Intron Splice Site PCR Analysis as A Tool to Discriminate *Dekkera bruxellensis* strains. *Ann. Microbiol.* 2011, *61*, 153–157, doi:10.1007/s13213-010-0110-8.
- Oelofse, A.; Lonvaud-Funel, A.; du Toit, M. Molecular Identification of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Red Wines and volatile Phenol Production. *Food Microbiol.* 2009, *26*, 377–385, doi:10.1016/j.fm.2008.10.011.
- Albertin, W.; Panfili, A.; Miot-Sertier, C.; Goulielmakis, A.; Delcamp, A.; Salin, F.; Lonvaud-Funel, A.; Curtin, C.; Masneuf-Pomarede, I. Development of Microsatellite Markers for the Rapid and Reliable Genotyping of *Brettanomyces bruxellensis* at Strain Level. *Food Microbiol.* 2014, *42*, 188–195, doi:10.1016/j.fm.2014.03.012.
- Avramova, M.; Cibrario, A.; Peltier, E.; Coton, M.; Avram, E.; Schacherer, J.; Spano, G.; Capozzi, V.; Blaiotta, G.; Salin, F.; et al. *Brettanomyces bruxellensis* Population Survey Reveals A Diploid-Triploid Complex Structured according to Substrate of Isolation and Geographical Distribution. *Sci. Rep.*

- 2018, 8, 4136, doi:10.1038/s41598-018-22580-7.
30. Dimopoulou, M.; Hatzikamari, M.; Masneuf-Pomarede, I.; Albertin, W. Sulfur Dioxide Response of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Greek Wine. *Food Microbiol.* 2019, 78, 155-163, doi:10.1016/j.fm.2018.10.013.
 31. Mitrakul, C.M.; Henick-Kling, T.; Egli, C.M. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* Yeast Isolates from Wine by Using Various DNA Fingerprinting Methods. *Food Microbiol.* 1999, 16, 3-14, doi:10.1006/fmic.1998.0217.
 32. Crauwels, S.; Zhu, B.; Steensels, J.; Busschaert, P.; De Samblanx, G.; Marchal, K.; Willems, K.A.; Verstrepen, K.J.; Lievens, B. Assessing Genetic Diversity among *Brettanomyces* Yeasts by DNA Fingerprinting and Whole-Genome Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014, 80, 4398-4413, doi:10.1128/AEM.00601-14.
 33. Agnolucci, M.; Vigentini, I.; Capurso, G.; Merico, A.; Tirelli, A.; Compagno, C.; Foschino, R.; Nuti, M. Genetic Diversity and Physiological Traits of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Tuscan Sangiovese Wines. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 130, 238-244, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.025.
 34. Godoy, L.; Garrido, D.; Martínez, C.; Saavedra, J.; Combina, M.; Ganga, M.A. Study of the Coumarate Decarboxylase and Vinylphenol Reductase Activities of *Dekkera bruxellensis* (anamorph *Brettanomyces bruxellensis*) Isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009, 48, 452-457, doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02556.x.
 35. G-Poblete, C.; Peña-Moreno, I.C.; de Morais, M.A.; Moreira, S.; Ganga, M.A. Biodiversity among *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Different Wine Regions of Chile: Key Factors Revealed about Its Tolerance to Sulphite. *Microorganisms* 2020, 8, 557, doi:10.3390/microorganisms8040557.
 36. Oro, L.; Canonico, L.; Marinelli, V.; Ciani, M.; Comitini, F. Occurrence of *Brettanomyces bruxellensis* on Grape Berries and in Related Winemaking Cellar. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 415, doi:10.3389/fmicb.2019.00415.
 37. Sangorrín, M.P.; García, V.; Lopes, C.A.; Sáez, J.S.; Martínez, C.; Ganga, M.A. Molecular and Physiological Comparison of Spoilage Wine Yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 2013, 114, 1066-1074, doi:10.1111/jam.12134.
 38. Quesada, M.P.; Cenis, J.L. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the Characterization of Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 1995, 46, 204-208.
 39. Giraffa, G.; Carminati, D. Molecular Techniques in Food Fermentation: Principles and Applications. In *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*; Cocolin, L., Ercolini, D., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2008; pp. 1-30 ISBN 978-0-387-74519-0.
 40. Moen, E.; Bannon, D.; Kudo, T.; Graf, W.; Covert, M.; Van Valen, D. Deep Learning for Cellular Image Analysis. *Nat. Methods* 2019, 16, 1233-1246, doi:10.1038/s41592-019-0403-1.
 41. Jones, W.; Alasoo, K.; Fishman, D.; Parts, L. Computational biology: Deep learning. *Emerg. Top. Life Sci.* 2017, 1, 133-150, doi:10.1042/ETLS20160025.
 42. Kang, R.; Park, B.; Eady, M.; Ouyang, Q.; Chen, K. Single-Cell Classification of Foodborne Pathogens Using Hyperspectral Microscope Imaging Coupled with Deep Learning Frameworks. *Sens. Actuators B Chem.* 2020, 309, 127789, doi:10.1016/j.snb.2020.127789.
 43. Alzubaidi, L.; Fadhel, M.A.; Al-Shamma, O.; Zhang, J.; Duan, Y. Deep Learning Models for Classification of Red Blood Cells in Microscopy Images to Aid in Sickle Cell Anemia Diagnosis. *Electronics* 2020, 9, 427, doi:10.3390/electronics9030427.
 44. Longden, J.; Robin, X.; Engel, M.; Ferkinghoff-Borg, J.; Kjær, I.; Horak, I.D.; Pedersen, M.W.; Linding, R. Deep Neural Networks Identify Signaling Mechanisms of ErbB-Family Drug Resistance from A Continuous Cell Morphology Space. *Cell Rep.* 2021, 34, 108657, doi:10.1016/j.celrep.2020.108657.
 45. Dickinson, J.R. Filament formation in *Saccharomyces cerevisiae*—A review. *Folia Microbiol.* 2008, 53, 3-14, doi:10.1007/s12223-008-0001-6.
 46. Louw, M.; du Toit, M.; Alexandre, H.; Divol, B. Comparative Morphological Characteristics of Three *Brettanomyces bruxellensis* Wine Strains in the Presence/Absence of Sulfur Dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 2016, 238, 79-88, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.040.
 47. Echeverrigaray, S.; Randon, M.; da Silva, K.; Zacaria, J.; Delamare, A.P.L. Identification and Characterization of Non-*Saccharomyces* Spoilage Yeasts Isolated from Brazilian Wines. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 29, 1019-1027, doi:10.1007/s11274-013-1265-9.
 48. Aguilar-Uscanga, M.G.; Delia, M.-L.; Strehaiano, P. Nutritional Requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: Growth and Physiology in Batch and chemostat cultures. *Can. J. Microbiol.* 2000, 46, 1046-1050, doi:10.1139/w00-089.
 49. Vigentini, I.; Lucy Joseph, C.M.; Picozzi, C.; Foschino, R.; Bisson, L.F. Assessment of the *Brettanomyces bruxellensis* Metabolome during Sulphur Dioxide Exposure. *FEMS Yeast Res.* 2013, 13, 597-608, doi:10.1111/1567-1364.12060.
 50. Oelofse, A. Investigating the Role of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking. Ph.D. Thesis, Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa, December 2008.
 51. Lentz, M.; Putzke, T.; Hessler, R.; Luman, E. Genetic and Physiological Characterization of Yeast Isolated from Ripe Fruit and Analysis of Fermentation and Brewing Potential. *J. Inst. Brew.* 2014, 120, 559-564, doi:10.1002/jib.154.
 52. Giaever, G.; Chu, A.M.; Ni, L.; Connelly, C.; Riles, L.; Véronneau, S.; Dow, S.; Lucanu-Danila, A.; Anderson, K.; André, B.; et al. Functional Profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* Genome. *Nature* 2002, 418, 387-391, doi:10.1038/nature00935.
 53. Song, Q.; Kumar, A. An Overview of Autophagy and Yeast Pseudohyphal Growth: Integration of Signaling Pathways during Nitrogen Stress. *Cells* 2012, 1, 263-283, doi:10.3390/cells1030263.
 54. Cullen, P.J.; Sprague, G.F. The Regulation of Filamentous Growth in Yeast. *Genetics* 2012, 190, 23-49, doi:10.1534/genetics.111.127456.
 55. Cullen, P.J.; Sprague, G.F. Glucose Depletion Causes Haploid Invasive Growth in Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 13619-13624, doi:10.1073/pnas.240345197.
 56. Kuzdzal-Fick, J.J.; Chen, L.; Balázsi, G. Disadvantages and Benefits of Evolved Unicellularity Versus Multicellularity in Budding Yeast. *Ecol. Evol.* 2019, 9, 8509-8523, doi:10.1002/ece3.5322.
 57. Smukalla, S.; Caldara, M.; Pochet, N.; Beauvais, A.; Guadagnini, S.; Yan, C.; Vinces, M.D.; Jansen, A.; Prevost, M.C.; Latgé, J.-P.; et al. *FLO1* Is A Variable Green Beard Gene that Drives Biofilm-Like Cooperation in Budding Yeast. *Cell* 2008, 135, 726-737, doi:10.1016/j.cell.2008.09.037.
 58. Opalek, M.; Wloch-Salamon, D. Aspects of Multicellularity in *Saccharomyces cerevisiae* Yeast: A Review of Evolutionary and Physiological Mechanisms. *Genes* 2020, 11, 690, doi:10.3390/genes11060690.
 59. Goossens, K.V.Y.; Ielasi, F.S.; Nookaew, I.; Stals, I.; Alonso-Sarduy, L.; Daenen, L.; Van Mulders, S.E.; Stassen, C.; van Eijsden, R.G.E.; Siewers, V.; et al. Molecular Mechanism of Flocculation Self-Recognition in Yeast and Its Role in Mating and Survival. *MBio* 2015, 6, e00427-15, doi:10.1128/mBio.00427-15.

6. Supplementary data

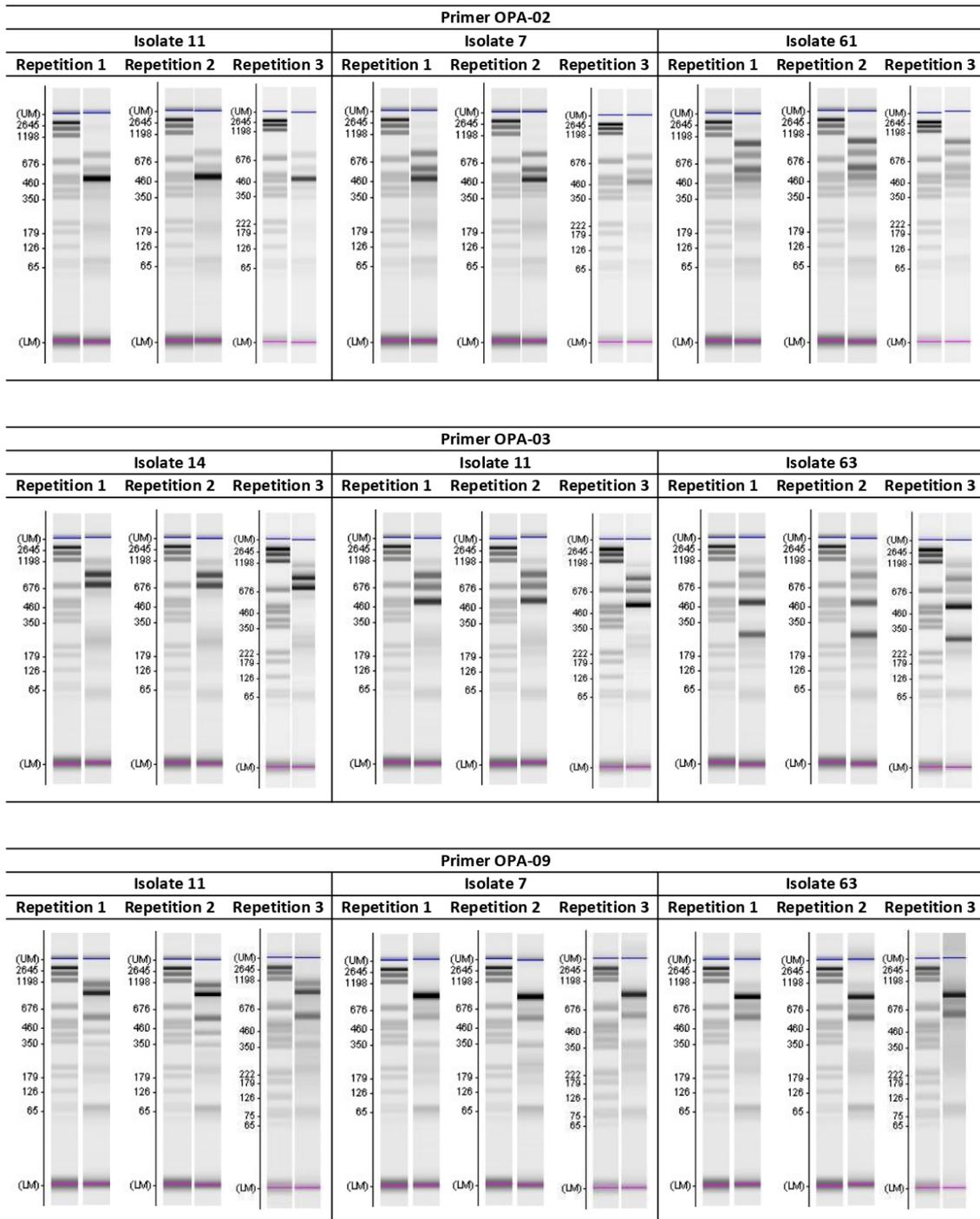


Figure 3.S1. Verification of the reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR) adapted method. For each primer (OPA-02, OPA-03 and OPA-09), the profiles of 3 independent repetitions of the protocol are provided for 3 isolates.

Conclusions et perspectives

La persistance de la levure *Brettanomyces bruxellensis* et la contamination récurrente du vin est une véritable problématique pour la filière viti-vinicole. Afin de gérer au mieux cette levure d'altération et limiter les intrants chimiques, il est nécessaire d'améliorer nos connaissances sur les stratégies qu'elle peut mettre en place pour résister et subsister dans l'environnement dans le but d'adapter efficacement les moyens de contrôle. Dans ce travail de thèse, nous avons apporté de nouvelles pistes pouvant expliquer la persistance de *B. bruxellensis* dans l'environnement, en étudiant la formation de biofilm chez cette levure, un mode de vie redouté dans l'industrie agro-alimentaire quand il s'agit de micro-organismes d'altération ou pathogènes.

1. Diversité de phénotypes, de la cellule à la population

Au cours des différentes expériences menées pour étudier la formation de biofilm chez *B. bruxellensis*, une importante diversité de phénotypes a été mise en évidence aussi bien à l'échelle de la cellule (polymorphisme des cellules levure, production de filaments, de « chlamydospore-like ») qu'à l'échelle de la population (formation de biofilm, de communautés « biofilm-like », capacité d'invasion).

A l'échelle de la cellule, une diversité de morphologie des cellules levures a été observée et liée dans notre étude aux groupes génétiques précédemment établis chez l'espèce *B. bruxellensis* (Avramova *et al.*, 2018a). Dans ce travail de thèse, d'autres types de cellules ont été mis en évidence, notamment des filaments. Ce morphotype cellulaire a déjà été observé chez des souches de *B. bruxellensis* en culture planctonique (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000; Louw *et al.*, 2016). Il apparaît que ces formes filamenteuses jouaient un rôle important dans le mode de vie biofilm, formant un véritable réseau parcourant et structurant l'ensemble de l'édifice. Les filaments semblent également être un élément majoritaire au sein des structures macroscopiques développées à la surface du milieu (biofilm air-liquide), rappelant la composition du biofilm développé sur support. Bien que l'espèce *B. bruxellensis* ait été identifiée dans des biofilms air-liquide (David-Vaizant and Alexandre, 2018; Harrison and Curtin, 2021), sa capacité à former ce type de biofilms n'a pas encore été étudiée en détail.

Ensuite, les filaments ont également été retrouvés dans les structures multicellulaires développées à l'intérieur de la gélose lors de l'invasion de cette dernière. La forme filamenteuse semble être un élément permettant l'exploration de l'environnement distant de la position initiale de cellules non mobiles. Ainsi, compte tenu de leur implication dans les différents phénotypes de *B. bruxellensis*, les filaments apparaissent comme un morphotype important chez

cette espèce. L'étude spécifique de la filamentation chez *B. bruxellensis* permettrait d'apporter de nouvelles informations sur leurs conditions de production et leur rôle, notamment en lien avec le mode de vie biofilm. Chez d'autres levures comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, la formation de filaments est décrite comme une réponse des micro-organismes aux changements nutritionnels survenant dans le milieu (Cullen and Sprague, 2012; Gagiano *et al.*, 2002; Rutherford *et al.*, 2019). Chez *B. bruxellensis*, il a été suggéré que la présence ou l'absence de certains nutriments pouvaient influencer la production de filaments. En effet, une étude a reporté qu'en absence de sulfate d'ammonium, aucune production de filaments n'a été observée (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000). Cependant, lors nos travaux, les souches de *B. bruxellensis* étudiées ont été capables de former des filaments lors de l'invasion de l'agar dans des conditions similaires. De même pour le SO₂, des études ont émises des conclusions contradictoires sur son rôle inducteur dans la formation de filaments (Louw *et al.*, 2016; Vigentini *et al.*, 2013). Enfin, certaines études indiquent que la filamentation chez *B. bruxellensis* est souche dépendante (Echeverrigaray *et al.*, 2013; Louw *et al.*, 2016).

Les filaments produits par *B. bruxellensis* sont également liés à un autre type cellulaire nouvellement décrit chez *B. bruxellensis* dans ce projet de thèse, les « chlamyospore-like ». Ces éléments ont été produits par la levure dans diverses conditions (culture planctonique, biofilm, « biofilm-like », invasion de la gélose, milieu YPD, vin). Des travaux ultérieurs devront être réalisés pour continuer la caractérisation de ces éléments en validant notamment des critères supplémentaires les définissant comme des chlamyospores (par exemple, présence de larges particules lipidiques et production dans des conditions spécifiques) et en définissant leur rôle chez *B. bruxellensis*. Chez *Candida* spp., les chlamyospores sont produites dans des conditions difficiles (faible disponibilité en nutriment et en oxygène, faible température ...), suggérant leur rôle dans la résistance au stress (Staib and Morschhäuser, 2007). Ainsi, il peut être envisagé que la production de « chlamyospore-like » chez *B. bruxellensis* soit une nouvelle piste pour expliquer la persistance de *B. bruxellensis*.

2. Caractérisation de la matrice du biofilm de *B. bruxellensis*

La matrice est un constituant essentiel dans le mode de vie biofilm. Outre les différents morphotypes impliqués dans le biofilm de *B. bruxellensis*, la présence de matrice a été mise en évidence dans les micro-colonies adhérentes et développées sur le support. Les EPS de la matrice d'un biofilm déterminent en grande partie les propriétés mécaniques du biofilm, et assurent de nombreuses fonctions avantageuses pour les micro-organismes contenus au sein du biofilm.

Les rôles des EPS dépendent de leur nature et leur proportion. Chez le modèle levurien *C. albicans*, les fractions majoritaires sont les glucides et les protéines, suivies par les lipides et les acides nucléiques (Pierce *et al.*, 2017; Zarnowski *et al.*, 2014). Chez *B. bruxellensis*, très peu de données sont disponibles. Une récente étude qui compare des cellules planctoniques et des cellules adhérentes après 3 heures d'incubation par analyse FTIR suggère une présence plus importante de β -glucane, mannane et ergostérol chez la population biofilm (Dimopoulou *et al.*, 2021). Afin de caractériser la matrice du biofilm de *B. bruxellensis*, différents angles d'études peuvent être envisagés.

Tout d'abord, des observations microscopiques sont couramment mises en œuvre pour analyser *in situ* de la matrice d'un biofilm. L'utilisation de sondes fluorescentes ou d'anticorps marqués permettraient de cibler et visualiser différents composés de la matrice. En particulier, des observations par microscopie confocale à balayage laser de biofilms marqués seraient notamment adaptées pour obtenir une visualisation en 3D de la structure et évaluer la distribution et la localisation des EPS dans le biofilm au cours de son développement ou selon différentes conditions (Azeredo *et al.*, 2017).

Ensuite, les composés de la matrice peuvent faire l'objet d'une étude physicochimique. Les EPS de la matrice peuvent être extraits du biofilm pour être analysés. Ainsi, des méthodes de profilage peuvent être utilisées pour obtenir des informations sur les composés de la matrice telles que le pHi des protéines, la masse moléculaire ou la nature des groupes fonctionnels (Bhardwaj *et al.*, 2013; Faria-Oliveira *et al.*, 2015, 2014; Lattif *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2016b). Par ailleurs, des techniques de quantification globale pourraient permettre d'évaluer la part de différentes fractions telles que les fractions de glucides, protéines, lipides ou acides nucléiques (Al-Fattani and Douglas, 2006; Ramos *et al.*, 2020; Zarnowski *et al.*, 2014).

Les données obtenues à propos de la matrice pourront aider au développement de solutions pour prévenir la formation de biofilm ou désorganiser les biofilms établis. En effet, cela permettrait d'identifier des potentielles cibles pour un traitement visant à éliminer les biofilms, telles que l'utilisation d'enzymes pour déstructurer le biofilm (Al-Fattani and Douglas, 2006), ce qui permet ensuite une meilleure action des agents antimicrobiens.

3. Déterminants environnementaux et génétiques de la formation de biofilm

Dans la littérature, il est clairement reconnu que l'environnement impacte la formation de biofilm dans son ensemble, de l'adhésion à la dispersion, en passant par sa structure et la

composition de la matrice (Bowden and Li, 1997; Goller and Romeo, 2008; Toyofuku *et al.*, 2016). Il a été montré dans ce travail de thèse que *B. bruxellensis* ne fait pas exception à la règle, et que le support et le milieu dans lequel se développe le biofilm de *B. bruxellensis* ont une influence sur son développement, confirmant de précédentes études (Kregiel *et al.*, 2018; Tristezza *et al.*, 2010). Dans le but de déterminer les conditions propices ou non à l'établissement d'un biofilm de *B. bruxellensis*, l'impact de différentes conditions nutritionnelles sur la capacité d'adhésion de cette levure a été évalué. Ce travail a révélé que les souches de *B. bruxellensis* étudiées ont été capables d'adhérer dans toutes les conditions testées, même si l'absence de glucose semble affaiblir cette capacité. Il est bien connu que *B. bruxellensis* peut utiliser de nombreuses sources de carbone et d'azote et en faibles quantités (Crauwels *et al.*, 2015; Smith and Divol, 2016). Ainsi, il faudrait évaluer l'impact d'autres nutriments sur la formation de biofilm chez *B. bruxellensis*. Identifier les conditions nutritionnelles favorables pour la formation de biofilm permettrait de repérer des situations critiques pouvant conduire à l'implantation d'un biofilm et donc à limiter la persistance de *B. bruxellensis* dans l'environnement.

Les changements de conditions environnementales, notamment la disponibilité en nutriments, induisent une adaptation de la cellule à ces conditions. Pour cela, différents mécanismes à différents niveaux se mettent en place dans les cellules en réponse à un signal environnemental, dont des voies de signalisation (voies MAPK, Ras-AMPC-PKA et TOR). Nombreuses de ces voies sont connues pour être impliquées dans différents phénotypes chez les levures modèles (production de filaments, de chlamydospores, adhésion, formation de biofilm) (Böttcher *et al.*, 2016; Granek and Magwene, 2010; Karunanithi *et al.*, 2012; Vandermeulen and Cullen, 2020; Verstrepen and Klis, 2006). Par conséquent, les connaissances concernant l'implication de voies dans ces phénotypes permettraient d'identifier des cibles potentiellement importantes pour la formation de biofilm chez *B. bruxellensis*.

Pour cela, l'étude génétique apparaît essentielle pour une meilleure compréhension des voies de signalisation et des mécanismes impliqués dans la formation de biofilm chez cette levure. Il faudrait tout d'abord rechercher dans les génomes séquencés de *B. bruxellensis*, des gènes homologues à ceux décrits chez d'autres espèces comme impliqués dans les différentes voies et la formation de biofilm. Ensuite, il serait intéressant d'étudier l'expression de ces gènes d'intérêt au cours de la formation de biofilm et dans différentes conditions pour obtenir des marqueurs de l'état biofilm. Pour poursuivre la caractérisation génétique, des mutants de délétion pourraient être générés pour évaluer l'impact de ces gènes dans la formation de biofilm

chez *B. bruxellensis* en étudiant les phénotypes des mutants (capacité d'adhésion, production de matrice, de filaments). Toutefois, en raison des différents états de ploïdie possibles et de sa forte variabilité génétique intraspécifique, la manipulation de *B. bruxellensis* reste un défi (Di Canito *et al.*, 2021). Peu d'outils sont disponibles pour la manipulation génétique de *B. bruxellensis* et davantage de connaissances seraient nécessaires pour développer les outils génétiques adaptés à la manipulation efficace de l'espèce. Néanmoins, plusieurs approches déjà utilisées chez *B. bruxellensis* pourraient être employées à cette fin, telles que l'électroporation ou le système CRISPR/Cas9, un outil prometteur pour la manipulation génétique des levures (Di Canito *et al.*, 2021; Miklenić *et al.*, 2015; Varela *et al.*, 2020).

4. Prédiction des groupes génétiques

Un des axes de ce travail a consisté en l'établissement d'un outil permettant une discrimination intraspécifique au sein de l'espèce *B. bruxellensis* rapide, simple et peu coûteuse, puisque le groupe génétique d'un isolat peut être déterminé à partir d'une observation microscopique des cellules avec une précision de 96,6%. La mise en place de tels outils en œnologie permettrait de rendre plus accessibles certaines analyses qui nécessitent habituellement du matériel et du personnel spécialisé, comme des analyses génétiques utilisant la PCR dans le cas de notre étude.

Le CNN, modèle utilisé dans notre étude, présente l'avantage de pouvoir être amendé avec de nouvelles données afin d'améliorer les performances de l'analyse. En effet, plus les données d'entraînement sont représentatives et plus le nombre de cas est conséquent, plus le résultat fourni par le réseau est fiable et représentatif de la réalité. Ainsi, il serait pertinent de poursuivre le développement de cet outil en incluant davantage d'images pour l'entraînement du réseau. D'une part, les perfectionnements de l'outil pourraient consister en l'ajout de nouvelles souches. Il serait pertinent d'ajouter des données relatives aux deux autres groupes génétiques non étudiés dans ce travail de thèse. Ensuite, étant donné que certains groupes génétiques partagent des caractéristiques morphologiques communes, de nouvelles souches de *B. bruxellensis* de chaque groupe génétique pourraient être ajoutées à l'analyse. D'autre part, l'outil pourrait être perfectionné en diversifiant le protocole de culture des cellules et d'acquisition des images (par exemple, types de microscope, luminosité, densité cellulaire, état physiologique des cellules) pour que cette variabilité soit intégrée à l'apprentissage et que des différences entre les images qui ne sont pas liées aux cellules ne soient pas un critère de classification en groupes génétiques.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a permis d'apporter de nouvelles connaissances concernant différents phénotypes de la levure *Brettanomyces bruxellensis*, généralement connus pour être associés à la résistance aux stress. Cette espèce levurienne est capable de former des biofilms, un mode de vie redouté dans l'industrie agro-alimentaire pour son implication dans la contamination récurrente d'aliments. Le biofilm formé par *B. bruxellensis* est une structure développée en 3D peu épaisse et composée de cellules levures, de filaments formant un véritable réseau, le tout englobé dans une matrice. *B. bruxellensis* semble également capable de former des « biofilm-like » (biofilm air-liquide, colonie complexe), ainsi que d'envahir la gélose et de produire des « chlamydospore-like », jamais décrites jusqu'à présent. Ces derniers éléments sont décrits comme des formes de résistance chez certains fungi. Ainsi, les connaissances fondamentales acquises lors de ce projet apportent de nouveaux éléments à la compréhension des potentiels moyens mis en œuvre par *B. bruxellensis* pour persister dans l'environnement. Comprendre comment survit cette levure permettra d'adapter et développer des moyens de lutte appropriés afin de limiter son développement et de contrôler la contamination et l'altération du vin.

En plus de ces connaissances, un outil de « deep learning » a été adapté dans ce projet pour permettre une discrimination intraspécifique rapide au sein de l'espèce *B. bruxellensis* basée sur la morphologie des cellules. Cette approche nouvelle ouvre la voie à la mise en place de méthodes de routine rapides, simples et accessibles aux acteurs de la filière viti-vinicole pour la prévention des risques de contamination par *B. bruxellensis*.

Références bibliographiques

- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N.E., 2014. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.* 196, 453–472. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>
- Abdo, H., 2020. Biodiversité fongique dans une nouvelle cuverie et dynamique des populations en cuverie (*Saccharomyces cerevisiae*) et en cave d'élevage (*Brettanomyces bruxellensis*). Université Bourgogne Franche-Comté. NNT : 2020UBFCK018 . tel- 03023008.
- Abdo, H., Catacchio, C.R., Ventura, M., D'Addabbo, P., Alexandre, H., Guilloux-Bénatier, M., Rousseaux, S., 2020. The establishment of a fungal consortium in a new winery. *Sci. Rep.* 10, 7962. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64819-2>
- Adt, I., Kohler, A., Gognies, S., Budin, J., Sandt, C., Belarbi, A., Manfait, M., Sockalingum, G.D., 2010. FTIR spectroscopic discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* strains. *Can. J. Microbiol.* 56, 793–801. <https://doi.org/10.1139/W10-062>
- Agnolucci, M., Cristani, C., Maggini, S., Rea, F., Cossu, A., Tirelli, A., Nuti, M., 2014. Impact of sulphur dioxide on the viability, culturability, and volatile phenol production of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Ann. Microbiol.* 64, 653–659. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0698-6>
- Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., Nuti, M., 2010. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.022>
- Agnolucci, M., Tirelli, A., Cocolin, L., Toffanin, A., 2017. *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: impact on wine and winemaking. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2345-z>
- Agnolucci, M., Vigentini, I., Capurso, G., Merico, A., Tirelli, A., Compagno, C., Foschino, R., Nuti, M., 2009. Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.025>
- Aguilar-Uscanga, M.G., Delia, M.-L., Strehaiano, P., 2000. Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis* : Growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Can. J. Microbiol.* 46, 1046–1050. <https://doi.org/10.1139/w00-089>

- Aguilar-Uscanga, M.G., Délia, M.L., Strehaiano, P., 2003. *Brettanomyces bruxellensis*: Effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 157–162. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1197-z>
- Al-Fattani, M.A., Douglas, L.J., 2006. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. *J. Med. Microbiol.* 55, 999–1008. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46569-0>
- Albertin, W., Panfili, A., Miot-Sertier, C., Goulielmakis, A., Delcamp, A., Salin, F., Lonvaud-Funel, A., Curtin, C., Masneuf-Pomarede, I., 2014. Development of microsatellite markers for the rapid and reliable genotyping of *Brettanomyces bruxellensis* at strain level. *Food Microbiol.* 42, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.012>
- Albuquerque, P., Casadevall, A., 2012. Quorum sensing in fungi - a review. *Med. Mycol.* 50, 337–345. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.652201>
- Alem, M.A.S., Oteef, M.D.Y., Flowers, T.H., Douglas, L.J., 2006. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot. Cell* 5, 1770–1779. <https://doi.org/10.1128/EC.00219-06>
- Alim, D., Sircaik, S., Panwar, S.L., 2018. The significance of lipids to biofilm formation in *Candida albicans*: An emerging perspective. *J. Fungi* 4, 140. <https://doi.org/10.3390/jof4040140>
- Allan, V.J.M., Callow, M.E., Macaskie, L.E., Paterson-Beedle, M., 2002. Effect of nutrient limitation on biofilm formation and phosphatase activity of a *Citrobacter* sp. *Microbiology* 148, 277–288. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-277>
- Alston, J.M., Arvik, T., Hart, J., Lapsley, J.T., 2021. Brettanomics I : The cost of *Brettanomyces* in california wine production. *J. Wine Econ.* 16, 4–31. <https://doi.org/10.1017/jwe.2020.20>
- Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L.M., Briandet, R., Cotter, P.D., 2019. Biofilms in food processing environments: challenges and opportunities. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 10, 173–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121805>
- Alzubaidi, L., Fadhel, M.A., Al-Shamma, O., Zhang, J., Duan, Y., 2020. Deep learning models for classification of red blood cells in microscopy images to aid in sickle cell anemia diagnosis. *Electronics* 9, 427. <https://doi.org/10.3390/electronics9030427>

- Amoah-Buahin, E., Bone, N., Armstrong, J., 2005. Hyphal growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell* 4, 1287–1297. <https://doi.org/10.1128/EC.4.7.1287-1297.2005>
- Andersen, K.S., Bojsen, R., Sorensen, L.G.R., Nielsen, M.W., Lisby, M., Folkesson, A., Regenber, B., 2014. Genetic basis for *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in liquid medium. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 4, 1671–1680. <https://doi.org/10.1534/g3.114.010892>
- Arroyo-López, F.N., Bautista-Gallego, J., Domínguez-Manzano, J., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., García-García, P., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., 2012. Formation of lactic acid bacteria-yeasts communities on the olive surface during Spanish-style Manzanilla fermentations. *Food Microbiol.* 32, 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.003>
- Atherton, T.J., Kerbyson, D.J., 1999. Size invariant circle detection. *Image Vis. Comput.* 17, 795–803. [https://doi.org/10.1016/S0262-8856\(98\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0262-8856(98)00160-7)
- Avramova, M., Cibrario, A., Peltier, E., Coton, M., Coton, E., Schacherer, J., Spano, G., Capozzi, V., Blaiotta, G., Salin, F., Dols-Lafargue, M., Grbin, P., Curtin, C., Albertin, W., Masneuf-Pomarede, I., 2018a. *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. *Sci. Rep.* 8, 4136. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22580-7>
- Avramova, M., Grbin, P., Borneman, A., Albertin, W., Masneuf-Pomarède, I., Varela, C., 2019. Competition experiments between *Brettanomyces bruxellensis* strains reveal specific adaptation to sulfur dioxide and complex interactions at intraspecies level. *FEMS Yeast Res.* 19, foz010. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz010>
- Avramova, M., Vallet-Courbin, A., Maupeu, J., Masneuf-Pomarède, I., Albertin, W., 2018b. Molecular Diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis*' Sulfur Dioxide Sensitivity Through Genotype Specific Method. *Front. Microbiol.* 9, 1260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01260>
- Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačaniová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R.L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., Sternberg, C., 2017. Critical review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* 43, 313–351.

<https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>

- Baillie, G.S., Douglas, L.J., 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 48, 671–679. <https://doi.org/10.1099/00222615-48-7-671>
- Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.020>
- Barata, A., Laureano, P., D'Antuono, I., Martorell, P., Stender, H., Malfeito-Ferreira, M., Querol, A., Loureiro, V., 2013. Enumeration and identification of 4-ethylphenol producing yeasts recovered from the wood of wine ageing barriques after different sanitation treatments. *J. Food Res.* 2, 140–149. <https://doi.org/10.5539/jfr.v2n1p140>
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 1990. *Yeasts: Characteristics and identification* (Cambridge University Press).
- Bartel, C., Roach, M., Onetto, C., Curtin, C., Varela, C., Borneman, A., 2021. Adaptive evolution of sulfite tolerance in *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Yeast Res.* 21, foab036. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab036>
- Bartowsky, E.J., 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 149–156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02505.x>
- Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., 2008. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine-A review. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.016>
- Bastard, A., Coelho, C., Briandet, R., Canette, A., Gougeon, R., Alexandre, H., Guzzo, J., Weidmann, S., 2016. Effect of Biofilm Formation by *Oenococcus oeni* on Malolactic Fermentation and the Release of Aromatic Compounds in Wine. *Front. Microbiol.* 7, 613. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00613>
- Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2001. Pseudohyphal and Invasive Growth in *Saccharomyces cerevisiae*, in: *Applied Microbiology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 109–133. https://doi.org/10.1007/0-306-46888-3_8
- Beauvais, A., Loussert, C., Prevost, M.C., Verstrepen, K., Latgé, J.P., 2009. Characterization of a biofilm-like extracellular matrix in FLO1-expressing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Res.* 9, 411–419. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00482.x>

- Benítez-Cabello, A., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., Arroyo-López, F.N., 2015. Evaluation and identification of poly-microbial biofilms on natural green Gordal table olives. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108, 597–610. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0515-2>
- Benito, Calderón, Benito, 2019. The Influence of Non-*Saccharomyces* Species on Wine Fermentation Quality Parameters. *Fermentation* 5, 54. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030054>
- Berbegal, C., Garofalo, C., Russo, P., Pati, S., Capozzi, V., Spano, G., 2017. Use of Autochthonous Yeasts and Bacteria in Order to Control *Brettanomyces bruxellensis* in Wine. *Fermentation* 3, 65. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040065>
- Berbegal, C., Spano, G., Fragasso, M., Grieco, F., Russo, P., Capozzi, V., 2018. Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 569–576. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8666-x>
- Bester, M.C., Jacobson, D., Bauer, F.F., 2012. Many *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Protein Encoding Genes Are Coregulated by Mss11, but Cellular Adhesion Phenotypes Appear Only Flo Protein Dependent. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 2, 131–141. <https://doi.org/10.1534/g3.111.001644>
- Bhardwaj, C., Moore, J.F., Cui, Y., Gasper, G.L., Bernstein, H.C., Carlson, R.P., Hanley, L., 2013. Laser desorption VUV postionization MS imaging of a cocultured biofilm. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 6969–6977. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6454-0>
- Bidard, F., Blondin, B., Dequin, S., Vezinhet, F., & Barre, P. (1994). Cloning and analysis of a *FLO5* flocculation gene from *S. cerevisiae*. *Current Genetics*, 25(3), 196–201. <https://doi.org/10.1007/BF00357162>
- BIVB, 2017. Phénols volatils dans les vins rouges.
- Blankenship, J.R., Mitchell, A.P., 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.003>
- Blomqvist, J., Eberhard, T., Schnürer, J., Passoth, V., 2010. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1487–1497. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2619-y>
- Blomqvist, J., Nogué, V.S., Gorwa-Grauslund, M., Passoth, V., 2012. Physiological

- requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. *Yeast* 29, 265–274. <https://doi.org/10.1002/yea.2904>
- Blomqvist, J., Passoth, V., 2015. *Dekkera bruxellensis*—spoilage yeast with biotechnological potential, and a model for yeast evolution, physiology and competitiveness. *FEMS Yeast Res.* 15, fov021. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov021>
- Blondin, B., Ratomahenina, R., Arnaud, A., Galzy, P., 1982. A study of cellobiose fermentation by a *Dekkera* strain. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 2031–2037. <https://doi.org/10.1002/bit.260240910>
- Bojsen, R.K., Andersen, K.S., Regenber, B., 2012. *Saccharomyces cerevisiae* - a model to uncover molecular mechanisms for yeast biofilm biology. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 169–182. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00943.x>
- Borneman, A.R., Zeppel, R., Chambers, P.J., Curtin, C.D., 2014. Insights into the *Dekkera bruxellensis* Genomic Landscape: Comparative Genomics Reveals Variations in Ploidy and Nutrient Utilisation Potential amongst Wine Isolates. *PLoS Genet.* 10, e1004161. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004161>
- Böttcher, B., Pöllath, C., Staib, P., Hube, B., Brunke, S., 2016. *Candida* species rewired hyphae developmental programs for chlamyospore formation. *Front. Microbiol.* 7, 1697. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01697>
- Bou Zeidan, M., Zara, G., Viti, C., Decorosi, F., Mannazzu, I., Budroni, M., Giovannetti, L., Zara, S., 2014. L-Histidine Inhibits Biofilm Formation and *FLO11*-Associated Phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae* Flor Yeasts. *PLoS One* 9, e112141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112141>
- Boutibonnes, P., 2003. Antoni van Leeuwenhoek, 1683 : une image simple, simplement une image... *Genesis* 20, 71–80. <https://doi.org/10.3406/item.2003.1243>
- Bowden, G.H.W., Li, Y.H., 1997. Nutritional Influences on Biofilm Development. *Adv. Dent. Res.* 11, 81–99. <https://doi.org/10.1177/08959374970110012101>
- Branco, P., Coutinho, R., Malfeito-Ferreira, M., Prista, C., Albergaria, H., 2021. Wine Spoilage Control: Impact of Saccharomycin on *Brettanomyces bruxellensis* and Its Conjugated Effect with Sulfur Dioxide. *Microorganisms* 9, 2528. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122528>

- Branco, P., Francisco, D., Monteiro, M., Almeida, M.G., Caldeira, J., Arneborg, N., Prista, C., Albergaria, H., 2017. Antimicrobial properties and death-inducing mechanisms of saccharomycin, a biocide secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 159–171. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7755-6>
- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naïtali, M., Briandet, R., 2015. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.* 45, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>
- Brückner, S., Mösch, H.-U., 2012. Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 25–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00275.x>
- Campolongo, S., Rantsiou, K., Giordano, M., Gerbi, V., Cocolin, L., 2010. Prevalence and Biodiversity of *Brettanomyces bruxellensis* in Wine from Northwestern Italy. *Am. J. Enol. Vitic.* 61, 486–491. <https://doi.org/10.5344/ajev.2010.10034>
- Cañete, E., Chen, J., Martín, C., Rubio, B., 2018. Smart Winery: A Real-Time Monitoring System for Structural Health and Ullage in Fino Style Wine Casks. *Sensors* 18, 803. <https://doi.org/10.3390/s18030803>
- Capozzi, V., Di Toro, M.R., Grieco, F., Michelotti, V., Salma, M., Lamontanara, A., Russo, P., Orrù, L., Alexandre, H., Spano, G., 2016. Viable But Not Culturable (VBNC) state of *Brettanomyces bruxellensis* in wine: New insights on molecular basis of VBNC behaviour using a transcriptomic approach. *Food Microbiol.* 59, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.007>
- Capusoni, C., Arioli, S., Zambelli, P., Muktaduzzaman, M., Mora, D., Compagno, C., 2016. Effects of Oxygen Availability on Acetic Acid Tolerance and Intracellular pH in *Dekkera bruxellensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4673–4681. <https://doi.org/10.1128/AEM.00515-16>
- Carpentier, B., Cerf, O., 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 499–511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01587.x>
- Carstens, E., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 1998. Flocculation, Pseudohyphal Development and Invasive Growth in Commercial Wine Yeast Strains. *South African J. Enol. Vitic.* 19, 52–61. <https://doi.org/10.21548/19-2-2244>

- Cartwright, Z.M., Glawe, D.A., Edwards, C.G., 2018. Reduction of *Brettanomyces bruxellensis* populations from oak barrel staves using steam. *Am. J. Enol. Vitic.* 69, 400–409. <https://doi.org/10.5344/ajev.2018.18024>
- Caruso, M.C., Fiore, C., Contursi, M., Salzano, G., Paparella, A., Romano, P., 2002. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 159–163. <https://doi.org/10.1023/A:1014451728868>
- Casalone, E., Barberio, C., Cappellini, L., Polsinelli, M., 2005. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology. *Res. Microbiol.* 156, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.008>
- Castro-Martinez, C., Escudero-Abarca, B.I., Gomez-Rodriguez, J., Haymard-Jones, P.M., Aguilar-Uscanga, M.G., 2005. Effect of physical factors on acetic acid production in *Brettanomyces bruxellensis* strains. *J. Food Process Eng.* 28, 133–143. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2005.00393.x>
- Cavalheiro, M., Teixeira, M.C., 2018. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Front. Med.* 5, 28. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>
- Ceccato-Antonini, S.R., Sudbery, P.E., 2004. Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian J. Microbiol.* 35, 173–181. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000200001>
- Chandra, J., Mukherjee, P.K., 2015. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. *Microbiol. Spectr.* 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015>
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., 1995. The Influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 463–468.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., Lavigne, V., 1993. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci. Food Agric.* 62, 191–202. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740620213>
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60, 165–178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>
- Chemat, F., Zill-E-Huma, Khan, M.K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* 18, 813–835.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>

- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., Fink, G.R., 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 5048–5052. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401416101>
- Chescheir, S., Philbin, D., Osborne, J.P., 2015. Impact of *Oenococcus oeni* on wine hydroxycinnamic acids and volatile phenol production by *Brettanomyces bruxellensis*. *Am. J. Enol. Vitic.* 66, 357–362. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.14108>
- Chow, J., Dionne, H.M., Prabhakar, A., Mehrotra, A., Somboonthum, J., Gonzalez, B., Edgerton, M., Cullen, P.J., 2019. Aggregate Filamentous Growth Responses in Yeast. *mSphere* 4, e00702-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00702-18>
- Cibrario, A., 2017. Diversité génétique et phénotypique de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* : influence sur son potentiel d'altération des vins rouges. Université de Bordeaux. NNT : 2017BORD0923. tel-02170503.
- Cibrario, A., Miot-Sertier, C., Paulin, M., Bullier, B., Riquier, L., Perello, M.-C., de Revel, G., Albertin, W., Masneuf-Pomarède, I., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., 2020. *Brettanomyces bruxellensis* phenotypic diversity, tolerance to wine stress and wine spoilage ability. *Food Microbiol.* 87, 103379. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103379>
- Clark-Walker, G.D., McArthur, C.R., Daley, D.J., 1981. Does mitochondrial DNA length influence the frequency of spontaneous petite mutants in yeasts? *Curr. Genet.* 4, 7–12. <https://doi.org/10.1007/BF00376779>
- Claussen, N.H., 1904. On a Method for the Application of Hansen's Pure Yeast System in the Manufacturing of Well-Conditioned English Stock Beers. *J. Inst. Brew.* 10, 308–331. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1904.tb04656.x>
- Coenye, T., Kjellerup, B., Stoodley, P., Bjarnsholt, T., Participants, 2019 Biofilm Bash, 2020. The future of biofilm research – Report on the '2019 Biofilm Bash.' *Biofilm* 2, 100012. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100012>
- Coi, A.L., Bigey, F., Mallet, S., Marsit, S., Zara, G., Gladieux, P., Galeote, V., Budroni, M., Dequin, S., Legras, J.L., 2017. Genomic signatures of adaptation to wine biological ageing conditions in biofilm-forming flor yeasts. *Mol. Ecol.* 26, 2150–2166. <https://doi.org/10.1111/mec.14053>

- Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., Ciani, M., 2021. Yeast Interactions and Molecular Mechanisms in Wine Fermentation: A Comprehensive Review. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 7754. <https://doi.org/10.3390/ijms22147754>
- Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., Galli, E., Ciani, M., 2020. Purification and Characterization of WA18, a New Mycocin Produced by *Wickerhamomyces anomalus* Active in Wine Against *Brettanomyces bruxellensis* Spoilage Yeasts. *Microorganisms* 9, 56. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010056>
- Comitini, F., Ciani, M., 2011. *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiol. Lett.* 316, 77–82. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02194.x>
- Comitini, F., Ingeniis De, J., Pepe, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2004. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.040>
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., Geros, H., 2007. Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. *Food Glob. Sci. Books* 1, 1–22.
- Connell, L., Stender, H., Edwards, C.G., 2002. Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 322–324.
- Conterno, L., Fondazione, E., Henick-kling, T., 2010. *Brettanomyces/Dekkera* off-flavours and other wine faults associated with microbial spoilage, in: *Managing Wine Quality*. Elsevier, pp. 346–387. <https://doi.org/10.1533/9781845699987.346>
- Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Henick-kling, T., Bisson, L.F., 2006. Genetic and Physiological Characterization of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 139–147.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M.D., Valero, E., 2011. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.040>

- Corich, V., Mattiazzi, A., Soldati, E., Carraro, A., Giacomini, A., 2005. Sau-PCR, a novel amplification technique for genetic fingerprinting of microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6401–6406. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6401-6406.2005>
- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiol.* 25, 422–427. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.003>
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., 1975. The role of the bacterial cell envelope in antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* <https://doi.org/10.1093/jac/1.4.363>
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., Coton, E., 2017. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, fix048. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>
- Coulon, J., Perello, M.-C., Lonvaud-Funel, A., de Revel, G., Renouf, V., 2010. *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1450–1458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04561.x>
- Crauwels, S., Van Assche, A., de Jonge, R., Borneman, A.R., Verreth, C., Troels, P., De Samblanx, G., Marchal, K., Van de Peer, Y., Willems, K.A., Verstrepen, K.J., Curtin, C.D., Lievens, B., 2015. Comparative phenomics and targeted use of genomics reveals variation in carbon and nitrogen assimilation among different *Brettanomyces bruxellensis* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 9123–9134. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6769-9>
- Crauwels, S., Zhu, B., Steensels, J., Busschaert, P., De Samblanx, G., Marchal, K., Willems, K.A., Verstrepen, K.J., Lievens, B., 2014. Assessing Genetic Diversity among *Brettanomyces* Yeasts by DNA Fingerprinting and Whole-Genome Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4398–4413. <https://doi.org/10.1128/AEM.00601-14>
- Csank, C., Haynes, K., 2000. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 115–120. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00241-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00241-X)

- Cullen, P.J., 2015. The Plate-Washing Assay: A Simple Test for Filamentous Growth in Budding Yeast. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2015, 168–171. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot085068>
- Cullen, P.J., Sprague, G.F., 2012. The Regulation of Filamentous Growth in Yeast. *Genetics* 190, 23–49. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127456>
- Cullen, P.J., Sprague, G.F., 2000. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13619–13624. <https://doi.org/10.1073/pnas.240345197>
- Curtin, C., Kennedy, E., Henschke, P.A., 2012. Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* wine isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 56–61. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03257.x>
- Curtin, C., Varela, C., Borneman, A., 2015. Harnessing improved understanding of *Brettanomyces bruxellensis* biology to mitigate the risk of wine spoilage. *Aust. J. Grape Wine Res.* 21, 680–692. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12200>
- Curtin, C.D., Bellon, J.R., Henschke, P.A., Godden, P.W., de Barros Lopes, M.A., 2007. Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Res.* 7, 471–481. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00183.x>
- Curtin, C.D., Pretorius, I.S., 2014. Genomic insights into the evolution of industrial yeast species *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Yeast Res.* 14, 997–1005. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12198>
- Daniels, K.J., Park, Y.N., Srikantha, T., Pujol, C., Soll, D.R., 2013. Impact of environmental conditions on the form and function of *Candida albicans* biofilms. *Eukaryot. Cell* 12, 1389–1402. <https://doi.org/10.1128/EC.00127-13>
- Davaux, F., Leroy, J.-B., Royant, L., 2019. Stabilisation microbiologique des vins par utilisation de champs électriques pulsés. *BIO Web Conf.* 15, 02001. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191502001>
- David-Vaizant, V., Alexandre, H., 2018. Flor yeast diversity and dynamics in biologically aged wines. *Front. Microbiol.* 9, 2235. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02235>
- Day, M., 2013. Yeast Petites and Small Colony Variants: For Everything There Is a Season, in: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier Inc., pp. 1–41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00001-0>

- de Barros Lopes, M., Rainieri, S., Henschke, P.A., Langridge, P., 1999. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 915–924. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-915>
- de Barros Lopes, M., Soden, A., Henschke, P.A., Langridge, P., 1996. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4514–4520. <https://doi.org/10.1128/aem.62.12.4514-4520.1996>
- de Barros Pita, W., Leite, F.C.B., de Souza Liberal, A.T., Simões, D.A., de Moraes, M.A., 2011. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100, 99–107. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9568-z>
- de Barros Pita, W., Silva, D.C., Simões, D.A., Passoth, V., de Moraes, M.A., 2013a. Physiology and gene expression profiles of *Dekkera bruxellensis* in response to carbon and nitrogen availability. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104, 855–868. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9998-x>
- de Barros Pita, W., Tiukova, I., Leite, F.C.B., Passoth, V., Simões, D.A., de Moraes, M.A., 2013b. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. *Yeast* 30, 111–117. <https://doi.org/10.1002/yea.2945>
- De Deken, R.H., 1966. The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *J. Gen. Microbiol.* 44, 149–156. <https://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149>
- Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A., Ambrò, S., 2002. Fermentability of Grape Must after Inhibition with Dimethyl Dicarbonate (DMDC). *J. Agric. Food Chem.* 50, 5605–5611. <https://doi.org/10.1021/jf0256337>
- Delsart, C., Grimi, N., Boussetta, N., Miot Sertier, C., Ghidossi, R., Vorobiev, E., Mietton Peuchot, M., 2016. Impact of pulsed-electric field and high-voltage electrical discharges on red wine microbial stabilization and quality characteristics. *J. Appl. Microbiol.* 120, 152–164. <https://doi.org/10.1111/jam.12981>
- Desai, J., 2018. *Candida albicans* Hyphae: From Growth Initiation to Invasion. *J. Fungi* 4, 10. <https://doi.org/10.3390/jof4010010>
- Deveau, A., Hogan, D.A., 2011. Linking Quorum Sensing Regulation and Biofilm Formation by *Candida albicans*, in: Rumbaugh, K.P. (Ed.), *Quorum Sensing: Methods and Protocols*.

- pp. 219–233. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-971-0_16
- Di Canito, A., Foschino, R., Mazzieri, M., Vigentini, I., 2021. Molecular Tools to Exploit the Biotechnological Potential of *Brettanomyces bruxellensis*: A Review. *Appl. Sci.* 11, 7302. <https://doi.org/10.3390/app11167302>
- Di Toro, M.R., Capozzi, V., Beneduce, L., Alexandre, H., Tristezza, M., Durante, M., Tufariello, M., Grieco, F., Spano, G., 2015. Intraspecific biodiversity and ‘spoilage potential’ of *Brettanomyces bruxellensis* in Apulian wines. *LWT - Food Sci. Technol.* 60, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.059>
- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2003a. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiol.* 20, 567–574. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00152-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00152-1)
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2003b. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol.* 20, 377–384. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00023-6)
- Dickinson, J.R., 2008. Filament formation in *Saccharomyces cerevisiae* - A review. *Folia Microbiol. (Praha)*. 53, 3–14. <https://doi.org/10.1007/s12223-008-0001-6>
- Diesler, K., Golombek, P., Kromm, L., Scharfenberger-Schmeer, M., Durner, D., Schmarr, H.-G., Stahl, M.R., Briviba, K., Fischer, U., 2019. UV-C treatment of grape must: Microbial inactivation, toxicological considerations and influence on chemical and sensory properties of white wine. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 52, 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.01.005>
- Dimitrov, L.N., Brem, R.B., Kruglyak, L., Gottschling, D.E., 2009. Polymorphisms in Multiple Genes Contribute to the Spontaneous Mitochondrial Genome Instability of *Saccharomyces cerevisiae* S288C Strains. *Genetics* 183, 365–383. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.104497>
- Dimopoulou, M., Kefalloniti, V., Tsakanikas, P., Papanikolaou, S., Nychas, G.-J.E., 2021. Assessing the Biofilm Formation Capacity of the Wine Spoilage Yeast *Brettanomyces bruxellensis* through FTIR Spectroscopy. *Microorganisms* 9, 587. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030587>

- Dimopoulou, M., Renault, M., Dols-Lafargue, M., Albertin, W., Herry, J.-M., Bellon-Fontaine, M.-N., Masneuf-Pomarede, I., 2019. Microbiological, biochemical, physicochemical surface properties and biofilm forming ability of *Brettanomyces bruxellensis*. *Ann. Microbiol.* 69, 1217–1225. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01503-5>
- Divol, B., du Toit, M., Duckitt, E., 2012. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 601–613. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4186-x>
- Domínguez-Manzano, J., Olmo-Ruiz, C., Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., 2012. Biofilm formation on abiotic and biotic surfaces during Spanish style green table olive fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.011>
- Drees, B.L., Thorsson, V., Carter, G.W., Rives, A.W., Raymond, M.Z., Avila-Campillo, I., Shannon, P., Galitski, T., 2005. Derivation of genetic interaction networks from quantitative phenotype data. *Genome Biol.* 6, R38. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-4-r38>
- du Toit, W.J., Pretorius, I.S., Lonvaud-Funel, A., 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* 98, 862–871. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02549.x>
- Dunn, M.J., Fillinger, R.J., Anderson, L.M., Anderson, M.Z., 2020. Automated quantification of *Candida albicans* biofilm-related phenotypes reveals additive contributions to biofilm production. *npj Biofilms Microbiomes* 6, 36. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00149-5>
- Eberlein, C., Abou Saada, O., Friedrich, A., Albertin, W., Schacherer, J., 2021. Different trajectories of polyploidization shape the genomic landscape of the *Brettanomyces bruxellensis* yeast species. *Genome Res.* 31, 2316–2326. <https://doi.org/10.1101/gr.275380.121>
- Echeverrigaray, S., Randon, M., da Silva, K., Zacaria, J., Delamare, A.P.L., 2013. Identification and characterization of non-*Saccharomyces* spoilage yeasts isolated from Brazilian wines. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1019–1027. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1265-9>

- Edlin, D.A.N., Narbad, A., Dickinson, J.R., Lloyd, D., 1995. The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. FEMS Microbiol. Lett. 125, 311–315. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(94\)00516-T](https://doi.org/10.1016/0378-1097(94)00516-T)
- Escudier, J.L., Bes, M., Salmon, J.M., Caillé, D., Samson, A., 2014. Stress hydrique prolongé des vignes : comment adapter les pratiques œnologiques en conséquence ? Innov. Agron. 38, 67–86.
- Evers, M.S., Roullier-Gall, C., Morge, C., Sparrow, C., Gobert, A., Alexandre, H., 2021. Vitamins in wine: Which, what for, and how much? Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 20, 2991–3035. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12743>
- Faria-Oliveira, F., Carvalho, J., Belmiro, C.L.R., Martinez-Gomariz, M., Hernaez, M.L., Pavão, M., Gil, C., Lucas, C., Ferreira, C., 2014. Methodologies to generate, extract, purify and fractionate yeast ECM for analytical use in proteomics and glycomics. BMC Microbiol. 14, 244. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0244-0>
- Faria-Oliveira, F., Carvalho, J., Belmiro, C.L.R., Ramalho, G., Pavão, M., Lucas, C., Ferreira, C., 2015. Elemental biochemical analysis of the polysaccharides in the extracellular matrix of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Basic Microbiol. 55, 685–694. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400781>
- Fernandes, T., Silva, S., Henriques, M., 2015. *Candida tropicalis* biofilm's matrix -involvement on its resistance to amphotericin B. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 83, 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.015>
- Fernández de Ullivarri, M., Mendoza, L.M., Raya, R.R., 2018. Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potential biocontrol agent against wine spoilage yeasts. Biol. Control 121, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.03.008>
- Ferreira, D., Moreira, D., Costa, E.M., Silva, S., Pintado, M.M., Couto, J.A., 2013. The Antimicrobial Action of Chitosan Against the Wine Spoilage Yeast *Brettanomyces/Dekkera*. J. Chitin Chitosan Sci. 1, 240–245. <https://doi.org/10.1166/jcc.2013.1037>
- Finkel, J.S., Xu, W., Huang, D., Hill, E.M., Desai, J. V., Woolford, C.A., Nett, J.E., Taff, H., Norice, C.T., Andes, D.R., Lanni, F., Mitchell, A.P., 2012. Portrait of *Candida albicans* adherence regulators. PLoS Pathog. 8, e1002525.

- <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002525>
- Flemming, H.-C., 2016. EPS—Then and Now. *Microorganisms* 4, 41. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4040041>
- Flemming, H.-C., Baveye, P., Neu, T.R., Stoodley, P., Szewzyk, U., Wingender, J., Wuertz, S., 2021. Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond. *npj Biofilms Microbiomes* 7, 10. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00183-3>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H.-C., Wuertz, S., 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 247–260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Fong, J.N.C., Yildiz, F.H., 2015. Microbial Biofilms, in: M. Ghannoum, M. Parsek, M. Whiteley, P.K.M. (Ed.), *Microbial Biofilms*. ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 201–222. <https://doi.org/10.1128/9781555817466.ch10>
- Fox, E.P., Bui, C.K., Nett, J.E., Hartooni, N., Mui, M.C., Andes, D.R., Nobile, C.J., Johnson, A.D., 2015. An expanded regulatory network temporally controls *Candida albicans* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 96, 1226–1239. <https://doi.org/10.1111/mmi.13002>
- Fredericks, I.N., du Toit, M., Krügel, M., 2011. Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiol.* 28, 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.018>
- Fugelsang, K.C., Zoecklein, B.W., 2003. Population Dynamics and Effects of *Brettanomyces bruxellensis* Strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 294–300.
- G-Poblete, C., Peña-Moreno, I.C., de Moraes, M.A., Moreira, S., Ganga, M.A., 2020. Biodiversity among *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Different Wine Regions of Chile: Key Factors Revealed about Its Tolerance to Sulphite. *Microorganisms* 8, 557. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040557>

- Gagiano, M., Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2002. The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2, 433–470. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00133-2)
- Galafassi, S., Merico, A., Pizza, F., Hellborg, L., Molinari, F., Piškur, J., Compagno, C., 2011. *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1079–1088. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0885-4>
- Galdieri, L., Mehrotra, S., Yu, S., Vancura, A., 2010. Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *Omi. A J. Integr. Biol.* 14, 629–638. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0069>
- García-Falcón, M.S., Pérez-Lamela, C., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., 2007. Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chem.* 105, 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.006>
- García-Ríos, E., Guillamón, J.M., 2019. Sulfur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: Beyond *SSUI*. *Microb. Cell* 6, 527–530. <https://doi.org/10.15698/mic2019.12.699>
- García-Sánchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.M., D'Enfert, C., 2004. *Candida albicans* biofilms: A developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot. Cell* 3, 536–545. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.536-545.2004>
- Garijo, P., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., Garde-Cerdán, T., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., 2015. Analysis of grapes and the first stages of the vinification process in wine contamination with *Brettanomyces bruxellensis*. *Eur. Food Res. Technol.* 240, 525–532. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2351-4>
- Gerbaux, V., Briffox, C., Dumont, A., Krieger, S., 2009. Influence of inoculation with Malolactic bacteria on volatile phenols in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 60, 233–235.
- Giaouris, E.D., Nychas, G.J.E., 2006. The adherence of *Salmonella Enteritidis* PT4 to stainless steel: The importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiol.* 23, 747–752. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.02.006>
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., Fink, G.R., 1992. Unipolar cell divisions in the

- yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell* 68, 1077–1090. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90079-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90079-R)
- Ginjom, I., D'Arcy, B., Caffin, N., Gidley, M., 2011. Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. *Food Chem.* 125, 823–834. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.062>
- Giraffa, G., Carminati, D., 2008. Molecular Techniques in Food Fermentation: Principles and Applications, in: Cocolin, L., Ercolini, D. (Eds.), *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Springer, New York, NY, pp. 1–30. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74520-6>
- Gobert, A., 2019. Etude des besoins en azote des levures non-*Saccharomyces* en vinification : impact sur les fermentations séquentielles. Université de Bourgogne. tel-02191577.
- Godoy, L., García, V., Peña, R., Martínez, C., Ganga, M.A., 2014. Identification of the *Dekkera bruxellensis* phenolic acid decarboxylase (*PAD*) gene responsible for wine spoilage. *Food Control* 45, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.041>
- Godoy, L., Garrido, D., Martínez, C., Saavedra, J., Combina, M., Ganga, M.A., 2009. Study of the coumarate decarboxylase and vinylphenol reductase activities of *Dekkera bruxellensis* (anamorph *Brettanomyces bruxellensis*) isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 452–457. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02556.x>
- Godoy, L., Martínez, C., Carrasco, N., Ganga, M.A., 2008. Purification and characterization of a *p*-coumarate decarboxylase and a vinylphenol reductase from *Brettanomyces bruxellensis*. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.011>
- Godoy, L., Silva-Moreno, E., Mardones, W., Guzman, D., Cubillos, F.A., Ganga, A., 2017. Genomics Perspectives on Metabolism, Survival Strategies, and Biotechnological Applications of *Brettanomyces bruxellensis* LAMAP2480. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 27, 147–158. <https://doi.org/10.1159/000471924>
- Goller, C.C., Romeo, Tony, 2008. Environmental Influences on Biofilm Development, in: Romeo, T. (Ed.), *Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 37–66. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_3

- González-Arenzana, L., Santamaría, P., López, R., Garijo, P., Gutiérrez, A.R., Garde-Cerdán, T., López-Alfaro, I., 2013. Microwave technology as a new tool to improve microbiological control of oak barrels: A preliminary study. *Food Control* 30, 536–539. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.08.008>
- González-Arenzana, L., Sevenich, R., Rauh, C., López, R., Knorr, D., López-Alfaro, I., 2016. Inactivation of *Brettanomyces bruxellensis* by High Hydrostatic Pressure technology. *Food Control* 59, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.038>
- González, B., Vázquez, J., Cullen, P.J., Mas, A., Beltran, G., Torija, M.-J., 2018. Aromatic Amino Acid-Derived Compounds Induce Morphological Changes and Modulate the Cell Growth of Wine Yeast Species. *Front. Microbiol.* 9, 670. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00670>
- Gori, K., Knudsen, P.B., Nielsen, K.F., Arneborg, N., Jespersen, L., 2011. Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 11, 643–652. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00755.x>
- Govender, P., Domingo, J.L., Bester, M.C., Pretorius, I.S., Bauer, F.F., 2008. Controlled Expression of the Dominant Flocculation Genes *FLO1*, *FLO5*, and *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6041–6052. <https://doi.org/10.1128/AEM.00394-08>
- Gracin, L., Jambrak, A.R., Juretić, H., Dobrović, S., Barukčić, I., Grozdanović, M., Smoljanić, G., 2016. Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Appl. Acoust.* 103, 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.apacoust.2015.05.005>
- Granato, T.M., Romano, D., Vigentini, I., Foschino, R.C., Monti, D., Mamone, G., Ferranti, P., Nitride, C., Iametti, S., Bonomi, F., Molinari, F., 2015. New insights on the features of the vinyl phenol reductase from the wine-spoilage yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. *Ann. Microbiol.* 65, 321–329. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0864-5>
- Granchi, L., Romano, P., Mangani, S., Gurarrini, S., Vincenzini, M., 2005. Production of biogenic amines by wine microorganisms. *Bull. l'OIV* 78, 595–610.
- Granek, J.A., Magwene, P.M., 2010. Environmental and Genetic Determinants of Colony Morphology in Yeast. *PLoS Genet.* 6, e1000823.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000823>

- Grangeteau, C., Gerhards, D., Rousseaux, S., von Wallbrunn, C., Alexandre, H., Guilloux-Bénatier, M., 2015. Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation? *Food Microbiol.* 50, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.009>
- Grbin, P.R., Henschke, P.A., 2000. Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 255–262. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00186.x>
- Guerrero-Beltrán, J.A., Barbosa-Cánovas, G. V., 2004. Review: Advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Sci. Technol. Int.* 10, 137–147. <https://doi.org/10.1177/1082013204044359>
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R.J., 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 591–611. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>
- Guilloux-Bénatier, M., Chassagne, D., Alexandre, H., Charpentier, C., Feuillat, M., 2001. Influence de l' autolyse des levures apres fermentation sur le développement de *Brettanomyces/Dekkera* dans le vin. *J. Int. des Sci. la vigne du vin* 35, 157–164.
- Gulati, M., Nobile, C.J., 2016. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 18, 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>
- Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q., Fink, G.R., 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 12158–12163. <https://doi.org/10.1073/pnas.220420397>
- Guzzon, R., Larcher, R., Guarcello, R., Francesca, N., Settanni, L., Moschetti, G., 2018. Spoilage potential of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Italian wines. *Food Res. Int.* 105, 668–677. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.078>
- Haase, M.A.B., Kominék, J., Opulente, D.A., Shen, X.-X., LaBella, A.L., Zhou, X., DeVirgilio, J., Hulfachor, A.B., Kurtzman, C.P., Rokas, A., Hittinger, C.T., 2021. Repeated horizontal gene transfer of *GAL*actose metabolism genes violates Dollo's law of irreversible loss.

- Genetics 217, iyaa012. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyaa012>
- Harding, M.W., Marques, L.L.R., Howard, R.J., Olson, M.E., 2009. Can filamentous fungi form biofilms? Trends Microbiol. 17, 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.007>
- Harris, V., Ford, C.M., Jiranek, V., Grbin, P.R., 2008. *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media. Appl. Microbiol. Biotechnol. 78, 997–1006. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1328-7>
- Harris, V., Jiranek, V., Ford, C.M., Grbin, P.R., 2010. Inhibitory effect of hydroxycinnamic acids on *Dekkera* spp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86, 721–729. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2352-6>
- Harrison, K., Curtin, C., 2021. Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America. Microorganisms 9, 1060. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051060>
- Hawser, S.P., Baillie, G.S., Douglas, L.J., 1998. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. J. Med. Microbiol. 47, 253–256. <https://doi.org/10.1099/00222615-47-3-253>
- Hawser, S.P., Douglas, L.J., 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. Infect. Immun. 62, 915–921. <https://doi.org/10.1128/iai.62.3.915-921.1994>
- Hellborg, L., Piškur, J., 2009. Complex nature of the genome in a wine spoilage yeast, *Dekkera bruxellensis*. Eukaryot. Cell 8, 1739–1749. <https://doi.org/10.1128/EC.00115-09>
- Henrici, A.T., 1933. Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. J. Bacteriol. 25, 277–287. <https://doi.org/10.1128/jb.25.3.277-287.1933>
- Hope, E.A., Dunham, M.J., 2014. Ploidy-Regulated Variation in Biofilm-Related Phenotypes in Natural Isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. G3 Genes, Genomes, Genet. 4, 1773–1786. <https://doi.org/10.1534/g3.114.013250>
- Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., Nickerson, K.W., 2001. *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2982–2992. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2982-2992.2001>
- Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdignes, F., Jimenez, J., 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces*

- strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 998–1003.
- IFV, 2016. Guide de Bonnes Pratiques D'Hygiène Filière vins - Evaluation des risques et moyens de maîtrise.
- Iorizzo, M., Coppola, F., Letizia, F., Testa, B., Sorrentino, E., 2021. Role of Yeasts in the Brewing Process: Tradition and Innovation. *Processes* 9, 839. <https://doi.org/10.3390/pr9050839>
- Ishchuk, O.P., Zeljko, T.V., Schifferdecker, A.J., Wisén, S.M., Hagström, Å.K., Rozpędowska, E., Andersen, M.R., Hellborg, L., Ling, Z., Sibirny, A.A., Piškur, J., 2016. Novel centromeric loci of the wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis* *CEN1* and *CEN2*. *PLoS One* 11, e0161741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161741>
- Ishigami, M., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., Iimura, Y., 2004. *FLO11* is essential for flor formation caused by the C-terminal deletion of *NRG1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237, 425–430. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.012>
- ITV-France, 2006. *Brettanomyces* et phénols volatils, prévenir et limiter les altérations, Les cahiers itinéraires d'itv France.
- Jabra-Rizk, M.A., Shirliff, M., James, C., Meiller, T., 2006. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. *FEMS Yeast Res.* 6, 1063–1073. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00121.x>
- Jones, S.K., Hirakawa, M.P., Bennett, R.J., 2014. Sexual biofilm formation in *Candida tropicalis* opaque cells. *Mol. Microbiol.* 92, 383–398. <https://doi.org/10.1111/mmi.12565>
- Jones, W., Alasoo, K., Fishman, D., Parts, L., 2017. Computational biology: Deep learning. *Emerg. Top. Life Sci.* 1, 133–150. <https://doi.org/10.1042/ETLS20160025>
- Joseph, C.M.L., Gorton, L.W., Ebeler, S.E., Bisson, L.F., 2013. Production of Volatile Compounds by Wine Strains of *Brettanomyces bruxellensis* Grown in the Presence of Different Precursor Substrates. *Am. J. Enol. Vitic.* 64, 231–240. <https://doi.org/10.5344/ajev.2013.12095>
- Joseph, C.M.L., Kumar, G., Su, E., Bisson, L.F., 2007. Adhesion and Biofilm Production by Wine Isolates of *Brettanomyces bruxellensis*. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 373–378.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P., 1984. Evolution of acetic acid bacteria

- during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 153–156. <https://doi.org/10.1128/aem.48.1.153-156.1984>
- Kabwe, M.H., Vikram, S., Mulaudzi, K., Jansson, J.K., Makhalanyane, T.P., 2020. The gut mycobiota of rural and urban individuals is shaped by geography. *BMC Microbiol.* 20, 257. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01907-3>
- Kang, S., Choi, H., 2005. Effect of surface hydrophobicity on the adhesion of *S. cerevisiae* onto modified surfaces by poly(styrene-ran-sulfonic acid) random copolymers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 46, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.08.017>
- Karunanithi, S., Joshi, J., Chavel, C., Birkaya, B., Grell, L., Cullen, P.J., 2012. Regulation of Mat Responses by a Differentiation MAPK Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 7, e32294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032294>
- Klingberg, T.D., Lesnik, U., Arneborg, N., Raspor, P., Jespersen, L., 2008. Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* strains of clinical and nonclinical origin by molecular typing and determination of putative virulence traits. *FEMS Yeast Res.* 8, 631–640. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00365.x>
- Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006. The superficial life of microbes. *Nature* 441, 300–302. <https://doi.org/10.1038/441300a>
- Kontoyiannis, D.P., Tarrand, J., Prince, R., Samonis, G., Rolston, K.V.R., 2001. Effect of fluconazole on agar invasion by *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* 50, 78–82. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-1-78>
- Kregiel, D., James, S.A., Rygala, A., Berlowska, J., Antolak, H., Pawlikowska, E., 2018. Consortia formed by yeasts and acetic acid bacteria *Asaia* spp. in soft drinks. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111, 373–383. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0959-7>
- Križanović, S., Tomašević, M., Režek Jambrak, A., Čurko, N., Gracin, L., Lukić, K., Kovačević Ganić, K., 2020. Effect of Thermosonication and Physicochemical Properties of Wine on Culturability, Viability, and Metabolic Activity of *Brettanomyces bruxellensis* Yeast in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 68, 3302–3311. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03661>
- Kuchin, S., Vyas, V.K., Carlson, M., 2002. Snf1 Protein Kinase and the Repressors Nrg1 and Nrg2 Regulate *FLO11*, Haploid Invasive Growth, and Diploid Pseudohyphal

- Differentiation. Mol. Cell. Biol. 22, 3994–4000.
<https://doi.org/10.1128/MCB.22.12.3994-4000.2002>
- Kumamoto, C.A., 2005. A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. Proc. Natl. Acad. Sci. 102, 5576–5581.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0407097102>
- Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Jacq, C., Palková, Z., 2003. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. Mol. Microbiol. 47, 745–754.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03332.x>
- Laitila, A., Sarlin, T., Raulio, M., Wilhelmson, A., Kotaviita, E., Huttunen, T., Juvonen, R., 2011. Yeasts in malting, with special emphasis on *Wickerhamomyces anomalus* (synonym *Pichia anomala*). Antonie Van Leeuwenhoek 99, 75–84. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9511-8>
- Lam, S.S.T.H., Howell, K.S., 2015. *Drosophila*-associated yeast species in vineyard ecosystems. FEMS Microbiol. Lett. 362, fnv170. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv170>
- Lattey, K.A., Bramley, B.R., Francis, I.L., 2010. Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. Aust. J. Grape Wine Res. 16, 189–202. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00069.x>
- Lattif, A.A., Mukherjee, P.K., Chandra, J., Roth, M.R., Welti, R., Rouabhia, M., Ghannoum, M.A., 2011. Lipidomics of *Candida albicans* biofilms reveals phase-dependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation. Microbiology 157, 3232–3242. <https://doi.org/10.1099/mic.0.051086-0>
- Lebleux, M., Abdo, H., Coelho, C., Basmacıyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Weidmann, S., Rousseaux, S., 2020. New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life. Int. J. Food Microbiol. 318, 108464. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464>
- Lebleux, M., Denimal, E., De Oliveira, D., Marin, A., Desroche, N., Alexandre, H., Weidmann, S., Rousseaux, S., 2021. Prediction of Genetic Groups within *Brettanomyces bruxellensis* through Cell Morphology Using a Deep Learning Tool. J. Fungi 7, 581. <https://doi.org/10.3390/jof7080581>

- LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D., Lee, R.G., 1988. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2492–2499. <https://doi.org/10.1128/aem.54.10.2492-2499.1988>
- Legras, J.-L., Moreno-Garcia, J., Zara, S., Zara, G., Garcia-Martinez, T., Mauricio, J.C., Mannazzu, I., Coi, A.L., Bou Zeidan, M., Dequin, S., Moreno, J., Budroni, M., 2016. Flor Yeast: New Perspectives Beyond Wine Aging. *Front. Microbiol.* 7, 503. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00503>
- Leite, F.C.B., Basso, T.O., de Barros Pita, W., Gombert, A.K., Simões, D.A., de Morais, M.A., 2013. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. *FEMS Yeast Res.* 13, 34–43. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12007>
- Lentz, M., Putzke, T., Hessler, R., Luman, E., 2014. Genetic and physiological characterization of yeast isolated from ripe fruit and analysis of fermentation and brewing potential. *J. Inst. Brew.* 120, 559–564. <https://doi.org/10.1002/jib.154>
- Lewis, J.A., Elkon, I.M., McGee, M.A., Higbee, A.J., Gasch, A.P., 2010. Exploiting Natural Variation in *Saccharomyces cerevisiae* to Identify Genes for Increased Ethanol Resistance. *Genetics* 186, 1197–1205. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.121871>
- Li, F., Palecek, S.P., 2008. Distinct domains of the *Candida albicans* adhesin Eap1p mediate cell–cell and cell–substrate interactions. *Microbiology* 154, 1193–1203. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/013789-0>
- Li, F., Svarovsky, M.J., Karlsson, A.J., Wagner, J.P., Marchillo, K., Oshel, P., Andes, D., Palecek, S.P., 2007. Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. *Eukaryot. Cell* 6, 931–939. <https://doi.org/10.1128/EC.00049-07>
- Licker, J.L., Acree, T.E., Henick-Kling, T., 1998. What Is “Brett” (*Brettanomyces*) Flavor?: A Preliminary Investigation, in: Waterhouse, A.L., Ebeler, S.E. (Eds.), *Chemistry of Wine Flavor*. American Chemical Society: Whashington, DC, pp. 96–115. <https://doi.org/10.1021/bk-1998-0714.ch008>
- Lisanti, M.T., Blaiotta, G., Nioi, C., Moio, L., 2019. Alternative Methods to SO₂ for Microbiological Stabilization of Wine. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18, 455–479. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12422>
- Lo, W., Dranginis, A.M., 1998. The Cell Surface Flocculin Flo11 Is Required for Pseudohyphae

- Formation and Invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 9, 161–171.
<https://doi.org/10.1091/mbc.9.1.161>
- Lohse, M.B., Gulati, M., Johnson, A.D., Nobile, C.J., 2018. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 19–31.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>
- Longin, C., 2017. Développement de méthodes permettant la détection et la quantification de microorganismes d'altération du vin ; Etude de facteurs de développement. Thèse. Université de Bourgogne.
- Longin, C., Degueurce, C., Julliat, F., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., Alexandre, H., 2016a. Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Res. Int.* 89, 620–630. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.019>
- Longin, C., Julliat, F., Serpaggi, V., Maupeu, J., Bourbon, G., Rousseaux, S., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., 2016b. Evaluation of three *Brettanomyces* qPCR commercial kits: Results from an interlaboratory study. *Oeno One* 50, 223–230.
<https://doi.org/10.20870/oeno-one.2016.50.4.1274>
- Lopes, C.A., Jofré, V., Sangorrín, M.P., 2009. Spoilage yeasts in Patagonian winemaking: Molecular and physiological features of *Pichia guilliermondii* indigenous isolates. *Rev. Argent. Microbiol.* 41, 177–184.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 23–50. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00246-0)
- Louw, M., du Toit, M., Alexandre, H., Divol, B., 2016. Comparative morphological characteristics of three *Brettanomyces bruxellensis* wine strains in the presence/absence of sulfur dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 79–88.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.040>
- Mack, W.N., Mack, J.P., Ackerson, A.O., 1975. Microbial film development in a trickling filter. *Microb. Ecol.* 2, 215–226. <https://doi.org/10.1007/BF02010441>
- Madsen, M.G., Edwards, N.K., Petersen, M.A., Mokwena, L., Swiegers, J.H., Arneborg, N., 2017. Influence of *Oenococcus oeni* and *Brettanomyces bruxellensis* on hydroxycinnamic acids and volatile phenols of aged wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 68, 23–29.
<https://doi.org/10.5344/ajev.2016.16015>

- Maksimova, Y.G., 2014. Microbial biofilms in biotechnological processes. *Appl. Biochem. Microbiol.* 50, 750–760. <https://doi.org/10.1134/S0003683814080043>
- Malfeito-Ferreira, M., 2018. Two Decades of “Horse Sweat” Taint and *Brettanomyces* Yeasts in Wine: Where do We Stand Now? *Beverages* 4, 32. <https://doi.org/10.3390/beverages4020032>
- Mancera, E., Nocedal, I., Hammel, S., Gulati, M., Mitchell, K., Andes, D., Nobile, C., Butler, G., Johnson, A., 2021. Evolution of the complex transcription network controlling biofilm formation in *Candida* species. *Elife* 10, e64682. <https://doi.org/10.1101/2020.11.08.373514>
- Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., Budroni, M., Ciani, M., 2019. Yeast killer toxins: from ecological significance to application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 39, 603–617. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1601679>
- Martins, M., Uppuluri, P., Thomas, D.P., Cleary, I.A., Henriques, M., Lopez-Ribot, J.L., Oliveira, R., 2010. Presence of Extracellular DNA in the *Candida albicans* Biofilm Matrix and its Contribution to Biofilms. *Mycopathologia* 169, 323–331. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9264-y>
- Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernández-Espinar, M.T., Loureiro, V., Querol, A., 2006. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.014>
- Martyniak, B., Bolton, J., Kuksin, D., Shahin, S.M., Chan, L.L.Y., 2017. A novel concentration and viability detection method for *Brettanomyces* using the Cellometer image cytometry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44, 119–128. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1861-4>
- McCall, A.D., Pathirana, R.U., Prabhakar, A., Cullen, P.J., Edgerton, M., 2019. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. *npj Biofilms Microbiomes* 5, 21. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0094-5>
- Mehlomakulu, N.N., Setati, M.E., Divol, B., 2014. Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 188, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015>

- Miklenić, M., Žunar, B., Štafa, A., Svetec, I.-K., 2015. Improved electroporation procedure for genetic transformation of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. FEMS Yeast Res. 15, fov096. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov096>
- Miller, M.B., Bassler, B.L., 2001. Quorum Sensing in Bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55, 165–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. Lett. Appl. Microbiol. 30, 136–141. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00684.x>
- Miot-Sertier, C., Lonvaud-Funel, A., 2007. Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. J. Appl. Microbiol. 102, 555–562. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03069.x>
- Mitchell, K.F., Zarnowski, R., Andes, D.R., 2016a. Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. PLOS Pathog. 12, e1005828. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005828>
- Mitchell, K.F., Zarnowski, R., Andes, D.R., 2016b. The Extracellular Matrix of Fungal Biofilms. Adv. Exp. Med. Biol. 931, 21–35. https://doi.org/10.1007/5584_2016_6
- Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T., Egli, C.M., 1999. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA finger-printing methods. Food Microbiol. 16, 3–14. <https://doi.org/10.1006/fmic.1998.0217>
- Moen, E., Bannon, D., Kudo, T., Graf, W., Covert, M., Van Valen, D., 2019. Deep learning for cellular image analysis. Nat. Methods 16, 1233–1246. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0403-1>
- Monniot, C., Boisramé, A., Da Costa, G., Chauvel, M., Sautour, M., Bougnoux, M.E., Bellon-Fontaine, M.N., Dalle, F., D’Enfert, C., Richard, M.L., 2013. Rbt1 protein domains analysis in *Candida albicans* brings insights into hyphal surface modifications and Rbt1 potential role during adhesion and biofilm formation. PLoS One 8, e82395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082395>
- Moon, H., Kim, J.S., Oh, K.K., Kim, S.W., Hong, S.I., 2001. Kinetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation for ethanol production using steam-exploded wood with glucose- and cellobiose-fermenting yeast, *Brettanomyces custersii*. J. Microbiol.

Biotechnol.

- Morata, A., Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M.A., Sanz, P.D., Otero, L., Suárez-Lepe, J.A., 2015. Grape Processing by High Hydrostatic Pressure: Effect on Microbial Populations, Phenol Extraction and Wine Quality. *Food Bioprocess Technol.* 8, 277–286. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1405-8>
- Morata, A., Loira, I., Vejarano, R., González, C., Callejo, M.J., Suárez-Lepe, J.A., 2017. Emerging preservation technologies in grapes for winemaking. *Trends Food Sci. Technol.* 67, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.014>
- Nadell, C.D., Xavier, J.B., Levin, S.A., Foster, K.R., 2008. The Evolution of Quorum Sensing in Bacterial Biofilms. *PLoS Biol.* 6, e14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060014>
- Nardi, T., Remize, F., Alexandre, H., 2010. Adaptation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to winemaking conditions: A comparative study of stress genes expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 925–937. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2786-x>
- Naseem, S., Douglas, L., Konopka, J., 2020. *Candida albicans* Agar Invasion Assays. *BIO-PROTOCOL* 10, e3730. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3730>
- Naseem, S., Douglas, L.M., Konopka, J.B., 2019. *Candida albicans* rvs161 Δ and rvs167 Δ Endocytosis Mutants Are Defective in Invasion into the Oral Cavity. *MBio* 10, e02503-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02503-19>
- Navarathna, D.H.M.L.P., Pathirana, R.U., Lionakis, M.S., Nickerson, K.W., Roberts, D.D., 2016. *Candida albicans* ISW2 regulates chlamydospore suspensor cell formation and virulence *In Vivo* in a mouse model of disseminated candidiasis. *PLoS One* 11, e0164449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164449>
- Nett, J.E., Sanchez, H., Cain, M.T., Andes, D.R., 2010. Genetic Basis of *Candida* Biofilm Resistance Due to Drug-Sequestering Matrix Glucan. *J. Infect. Dis.* 202, 171–175. <https://doi.org/10.1086/651200>
- Nett, J.E., Sanchez, H., Cain, M.T., Ross, K.M., Andes, D.R., 2011. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. *Eukaryot. Cell* 10, 1660–1669. <https://doi.org/10.1128/EC.05126-11>
- Ng, T.S., Desa, M.N.M., Sandai, D., Chong, P.P., Than, L.T.L., 2016. Growth, biofilm

- formation, antifungal susceptibility and oxidative stress resistance of *Candida glabrata* are affected by different glucose concentrations. *Infect. Genet. Evol.* 40, 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.004>
- Nguyen, P. Van, Hlaváček, O., Maršíková, J., Váchová, L., Palková, Z., 2018. Cyc8p and Tup1p transcription regulators antagonistically regulate Flo11p expression and complexity of yeast colony biofilms. *PLOS Genet.* 14, e1007495. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007495>
- Nobile, C.J., Andes, D.R., Nett, J.E., Smith, F.J., Yue, F., Phan, Q.-T., Edwards, J.E., Filler, S.G., Mitchell, A.P., 2006a. Critical Role of Bcr1-Dependent Adhesins in *C. albicans* Biofilm Formation *In Vitro* and *In Vivo*. *PLoS Pathog.* 2, e63. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020063>
- Nobile, C.J., Fox, E.P., Nett, J.E., Sorrells, T.R., Mitrovich, Q.M., Hernday, A.D., Tuch, B.B., Andes, D.R., Johnson, A.D., 2012. A Recently Evolved Transcriptional Network Controls Biofilm Development in *Candida albicans*. *Cell* 148, 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.048>
- Nobile, C.J., Nett, J.E., Andes, D.R., Mitchell, A.P., 2006b. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot. Cell* 5, 1604–1610. <https://doi.org/10.1128/EC.00194-06>
- Nobile, C.J., Nett, J.E., Hernday, A.D., Homann, O.R., Deneault, J.-S., Nantel, A., Andes, D.R., Johnson, A.D., Mitchell, A.P., 2009. Biofilm Matrix Regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biol.* 7, e1000133. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000133>
- Nunes de Lima, A., Magalhães, R., Campos, F.M., Couto, J.A., 2021. Survival and metabolism of hydroxycinnamic acids by *Dekkera bruxellensis* in monovarietal wines. *Food Microbiol.* 93, 103617. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103617>
- Oelofse, A., 2008. Investigating the role of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking. Stellenbosch University, Institute for Wine Biotechnology, Faculty of AgriSciences.
- Oelofse, A., Lonvaud-Funel, A., du Toit, M., 2009. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiol.* 26, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.10.011>
- Oelofse, A., Malherbe, S., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2010. Preliminary evaluation of infrared

- spectroscopy for the differentiation of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.004>
- Oelofse, A., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review. *South African J. Enol. Vitic.* 29, 128–144. <https://doi.org/10.21548/29-2-1445>
- OIV, 2021. Note de conjoncture vitivinicole mondiale 2020.
- OIV, 2020. Inventaire des pratiques pour la réduction des doses de SO₂ en vinification.
- OIV, 2014. Code des bonnes pratiques vitivinicoles destinées à prévenir ou à limiter la contamination par *Brettanomyces*.
- Ojeda-Robertos, N.F., Torres-Acosta, J.F.J., Ayala-Burgos, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Valero-Coss, R.O., Mendoza-de-Gives, P., 2009. Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in ruminants: *in vitro* and *in vivo* studies. *BMC Vet. Res.* 5, 46. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-46>
- Oro, L., Canonico, L., Marinelli, V., Ciani, M., Comitini, F., 2019. Occurrence of *Brettanomyces bruxellensis* on Grape Berries and in Related Winemaking Cellar. *Front. Microbiol.* 10, 415. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00415>
- Oro, L., Ciani, M., Comitini, F., 2014. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1209–1217. <https://doi.org/10.1111/jam.12446>
- Paramonova, E., Krom, B.P., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Sharma, P.K., 2009. Hyphal content determines the compression strength of *Candida albicans* biofilms. *Microbiology* 155, 1997–2003. <https://doi.org/10.1099/mic.0.021568-0>
- Parente, D.C., Cajueiro, D.B.B., Moreno, I.C.P., Leite, F.C.B., de Barros Pita, W., De Moraes, M.A., 2018. On the catabolism of amino acids in the yeast *Dekkera bruxellensis* and the implications for industrial fermentation processes. *Yeast* 35, 299–309. <https://doi.org/10.1002/yea.3290>
- Pastorkova, E., Zakova, T., Landa, P., Novakova, J., Vadlejch, J., Kokoska, L., 2013. Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 161, 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.018>

- Paulin, M., Miot-Sertier, C., Dutilh, L., Brasselet, C., Delattre, C., Pierre, G., Dubessay, P., Michaud, P., Doco, T., Ballestra, P., Albertin, W., Masneuf-Pomarède, I., Moine, V., Coulon, J., Vallet-Courbin, A., Maupeu, J., Dols-Lafargue, M., 2020. *Brettanomyces bruxellensis* Displays Variable Susceptibility to Chitosan Treatment in Wine. *Front. Microbiol.* 11, 571067. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.571067>
- Perpetuini, G., Rossetti, A.P., Battistelli, N., Arfelli, G., Tofalo, R., 2021. Adhesion Properties, Biofilm Forming Potential, and Susceptibility to Disinfectants of Contaminant Wine Yeasts. *Microorganisms* 9, 654. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030654>
- Perpetuini, G., Tittarelli, F., Schirone, M., Di Gianvito, P., Corsetti, A., Arfelli, G., Suzzi, G., Tofalo, R., 2018. Adhesion properties and surface hydrophobicity of *Pichia manshurica* strains isolated from organic wines. *LWT* 87, 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.011>
- Péter, G., Dlačny, D., Tóbiás, A., Fülöp, L., Podgoršek, M., Čadež, N., 2017. *Brettanomyces acidodurans* sp. nov., a new acetic acid producing yeast species from olive oil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110, 657–664. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0832-8>
- Petrova, B., Cartwright, Z.M., Edwards, C.G., 2016. Effectiveness of chitosan preparations against *Brettanomyces bruxellensis* grown in culture media and red wines. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* 50, 49–56. <https://doi.org/10.20870/oenone.2016.50.1.54>
- Peynaud, E., Domercq, S., 1956. Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. *Arch. Mikrobiol.* 24, 266–280. <https://doi.org/10.1007/BF00419012>
- Pierce, C., Vila, T., Romo, J., Montelongo-Jauregui, D., Wall, G., Ramasubramanian, A., Lopez-Ribot, J., 2017. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. *J. Fungi* 3, 14. <https://doi.org/10.3390/jof3010014>
- Pilard, E., Harrouard, J., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Albertin, W., Ghidossi, R., 2021. Wine yeast species show strong inter- and intra-specific variability in their sensitivity to ultraviolet radiation. *Food Microbiol.* 100, 103864. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103864>
- Pina, C., Santos, C., Couto, J.A., Hogg, T., 2004. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. *Food Microbiol.* 21, 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.009>

- Pinto, L., Baruzzi, F., Cocolin, L., Malfeito-Ferreira, M., 2020. Emerging technologies to control *Brettanomyces* spp. in wine: Recent advances and future trends. *Trends Food Sci. Technol.* 99, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.013>
- Piškur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., Compagno, C., 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.* 22, 183–186. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.02.002>
- Poupault, P., 2015. Caractérisation des phénomènes de bio-adhésion à l'origine des altérations des vins, in: *Proceedings of the 10th International Symposium of Enology of Bordeaux. Vigne et vin publications internationales* (ed), Œno 2015, Bordeaux, France, pp. 234–237.
- Procházka, E., Poláková, S., Piškur, J., Sulo, P., 2010. Mitochondrial genome from the facultative anaerobe and petite-positive yeast *Dekkera bruxellensis* contains the NADH dehydrogenase subunit genes. *FEMS Yeast Res.* 10, 545–557. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00644.x>
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I., 2009. Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.035>
- Querol, A., Barrio, E., Ramón, D., 1992. A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439–446. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80219-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80219-5)
- Quesada, M.P., Cenis, J.L., 1995. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 204–208.
- Ramage, G., Saville, S.P., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L., 2002. Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5459–5463. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5459>
- Ramos, L.S., Mello, T.P., Branquinha, M.H., Santos, A.L.S., 2020. Biofilm Formed by *Candida haemulonii* Species Complex: Structural Analysis and Extracellular Matrix Composition. *J. Fungi* 6, 46. <https://doi.org/10.3390/jof6020046>
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1208–1219.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02959.x>

- Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol. Res.* 162, 154–167. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.02.006>
- Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., Coulon, J., 2007. The origin of *Brettanomyces bruxellensis* in wines: A review. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* 41, 161–173. <https://doi.org/10.20870/oenone.2007.41.3.846>
- Renouf, V., Miot-sertier, C., Perello, M.-C., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2009. Evidence for differences between *B. bruxellensis* strains originating from an enological environment. *Int. J. Wine Res.* 1, 95–100. <https://doi.org/10.2147/IJWR.S4612>
- Reynolds, T.B., Fink, G.R., 2001. Bakers' Yeast, a Model for Fungal Biofilm Formation. *Science.* 291, 878–881. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.878>
- Reynolds, T.B., Jansen, A., Peng, X., Fink, G.R., 2008. Mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* requires nutrient and pH gradients. *Eukaryot. Cell* 7, 122–130. <https://doi.org/10.1128/EC.00310-06>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2012a. *Traité d'oenologie : Microbiologie du vin et Vinification*, 6th ed. Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2012b. *Traité d'oenologie : Chimie du vin et Stabilisation et traitement*, 6th ed. Dunod, Paris.
- Roach, M.J., Borneman, A.R., 2020. New genome assemblies reveal patterns of domestication and adaptation across *Brettanomyces (Dekkera)* species. *BMC Genomics* 21, 194. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6595-z>
- Roberts, R.L., Fink, G.R., 1994. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.* 8, 2974–2985. <https://doi.org/10.1101/gad.8.24.2974>
- Rodrigues, N., Goncalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.* 90, 588–599. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01275.x>

- Romano, A., Perello, M.-C., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1577–1585. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03693.x>
- Romano, D., Valdetara, F., Zambelli, P., Galafassi, S., De Vitis, V., Molinari, F., Compagno, C., Foschino, R., Vigentini, I., 2017. Cloning the putative gene of vinyl phenol reductase of *Dekkera bruxellensis* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 63, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.003>
- Römling, U., Galperin, M.Y., 2015. Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol.* 23, 545–557. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.005>
- Roop, J.I., Brem, R.B., 2013. Rare Variants in Hypermutable Genes Underlie Common Morphology and Growth Traits in Wild *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics* 195, 513–525. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.155341>
- 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>
- Rozpędowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O.P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Woolfit, M., Compagno, C., Piškur, J., 2011. Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat. Commun.* 2, 302. <https://doi.org/10.1038/ncomms1305>
- Rubio, P., Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Martínez, J., Gutierrez, A.R., 2015. Influence of oak origin and ageing conditions on wine spoilage by *Brettanomyces* yeasts. *Food Control* 54, 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.034>
- Rutherford, J.C., Bahn, Y.-S., van den Berg, B., Heitman, J., Xue, C., 2019. Nutrient and stress sensing in pathogenic yeasts. *Front. Microbiol.* 10, 442. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00442>
- Sabel, A., Bredefeld, S., Schlander, M., Claus, H., 2017. Wine Phenolic Compounds: Antimicrobial Properties against Yeasts, Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria. *Beverages* 3, 29. <https://doi.org/10.3390/beverages3030029>

- Sanati Nezhad, A., Geitmann, A., 2013. The cellular mechanics of an invasive lifestyle. *J. Exp. Bot.* 64, 4709–4728. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert254>
- Sangorrín, M.P., García, V., Lopes, C.A., Sáez, J.S., Martínez, C., Ganga, M.A., 2013. Molecular and physiological comparison of spoilage wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1066–1074. <https://doi.org/10.1111/jam.12134>
- Santana, I.L., Gonçalves, L.M., de Vasconcellos, A.A., da Silva, W.J., Cury, J.A., Cury, A.A.D.B., 2013. Dietary Carbohydrates Modulate *Candida albicans* Biofilm Development on the Denture Surface. *PLoS One* 8, e64645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064645>
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., Marquina, D., 2009. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology* 155, 624–634. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023663-0>
- Scheffers, W.A., 1961. On the inhibition of alcoholic fermentation in *Brettanomyces* yeasts under anaerobic conditions. *Experientia* 17, 40–42.
- Schieber, A., Wüst, M., 2020. Volatile phenols—Important contributors to the aroma of plant-derived foods. *Molecules* 25, 4529. <https://doi.org/10.3390/molecules25194529>
- Schifferdecker, A.J., Dashko, S., Ishchuk, O.P., Piškur, J., 2014. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeast* 31, 323–332. <https://doi.org/10.1002/yea.3023>
- Schlafer, S., Meyer, R.L., 2017. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *J. Microbiol. Methods* 138, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.03.002>
- Schmid, F., Grbin, P., Yap, A., Jiranek, V., 2011. Relative efficacy of high-pressure hot water and high-power ultrasonics for wine oak barrel sanitization. *Am. J. Enol. Vitic.* 62, 519–526. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.11014>
- Schön, K., Schornsteiner, E., Dzieciol, M., Wagner, M., Müller, M., Schmitz-Esser, S., 2016. Microbial communities in dairy processing environment floor-drains are dominated by product-associated bacteria and yeasts. *Food Control* 70, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.057>
- Schopp, L.M., Lee, J., Osborne, J.P., Chescheir, S.C., Edwards, C.G., 2013. Metabolism of Nonesterified and Esterified Hydroxycinnamic Acids in Red Wines by *Brettanomyces*

- bruxellensis*. J. Agric. Food Chem. 61, 11610–11617. <https://doi.org/10.1021/jf403440k>
- Sebaa, S., Boucherit-Otmani, Z., Courtois, P., 2019. Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. Mol. Med. Rep. 19, 3201–3209. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9981>
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira Le Grand, A., Alexandre, H., 2012. Characterization of the “ viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. Food Microbiol. 30, 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.020>
- Serpaggi, V., Remize, F., Sequeira Le Grand, A., Alexandre, H., 2010. Specific identification and quantification of the spoilage microorganism *Brettanomyces* in wine by flow cytometry: A useful tool for winemakers. Cytom. Part A 77A, 497–499. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20861>
- Serra Colomer, M., Funch, B., Forster, J., 2019. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. Curr. Opin. Biotechnol. 56, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.009>
- Serrano-Fujarte, I., López-Romero, E., Reyna-López, G.E., Martínez-Gámez, M.A., Vega-González, A., Cuéllar-Cruz, M., 2015. Influence of Culture Media on Biofilm Formation by *Candida* Species and Response of Sessile Cells to Antifungals and Oxidative Stress. Biomed Res. Int. 2015, 783639. <https://doi.org/10.1155/2015/783639>
- Sidari, R., Caridi, A., Howell, K.S., 2014. Wild *Saccharomyces cerevisiae* strains display biofilm-like morphology in contact with polyphenols from grapes and wine. Int. J. Food Microbiol. 189, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.012>
- Silva, L.R., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R.M., Trujillo, M.E., Velázquez, E., 2005. Analysis of non-coloured phenolics in red wine: Effect of *Dekkera bruxellensis* yeast. Food Chem. 89, 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.019>
- Silva, P., Cardoso, H., Gerós, H., 2004. Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. Am. J. Enol. Vitic. 55, 65–72.
- Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., Azeredo, J., 2009. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. Med. Mycol. 47, 681–689. <https://doi.org/10.3109/13693780802549594>
- Simonin, S., Alexandre, H., Tourdot-maréchal, R., 2019. La bioprotection, une alternative

- biologique partielle ou totale à l'addition de sulfites. *Rev. des Oenologues* 173, 1–4.
- Smith, B.D., Divol, B., 2018. The carbon consumption pattern of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* in synthetic wine-like medium. *Food Microbiol.* 73, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.12.011>
- Smith, B.D., Divol, B., 2016. *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food Microbiol.* 59, 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.008>
- Smith, M.T., 2011. *Dekkera* van der Walt (1964), in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier B.V., pp. 373–377. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00025-2>
- Snowdon, E.M., Bowyer, M.C., Grbin, P.R., Bowyer, P.K., 2006. Mousy Off-Flavor: A Review. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6465–6474. <https://doi.org/10.1021/jf0528613>
- Soll, D.R., Daniels, K.J., 2016. Plasticity of *Candida albicans* Biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 565–595. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00068-15>
- Stadler, E., Fischer, U., 2020. Sanitization of Oak Barrels for Wine - A Review. *J. Agric. Food Chem.* 68, 5283–5295. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00816>
- Staib, P., Morschhäuser, J., 2007. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*? an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 50, 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01308.x>
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Verstrepen, K.J., 2015. *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 206, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>
- Stellato, G., De Filippis, F., La Stora, A., Ercolini, D., 2015. Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7893–7904. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-15>.Editor
- Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., 1998. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol.* 85, 19S–28S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05279.x>

- Storgårds, E., Tapani, K., Hartwall, P., Saleva, R., Suihko, M.-L., 2006. Microbial attachment and biofilm formation in brewery bottling plants. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 64, 8–15. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-64-0008>
- Sturm, M.E., Arroyo-López, F.N., Garrido-Fernández, A., Querol, A., Mercado, L.A., Ramirez, M.L., Combina, M., 2014. Probabilistic model for the spoilage wine yeast *Dekkera bruxellensis* as a function of pH, ethanol and free SO₂ using time as a dummy variable. *Int. J. Food Microbiol.* 170, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.019>
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chem.* 102, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.030>
- Sudbery, P.E., 2011. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 737–748. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2636>
- Suiker, I.M., Arkesteijn, G.J.A., Zeegers, P.J., Wösten, H.A.B., 2021. Presence of *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *diastaticus* in industry and nature and spoilage capacity of its vegetative cells and ascospores. *Int. J. Food Microbiol.* 347, 109173. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109173>
- Taylor, J. W. (2011). One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus*, 2(2), 113–120. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.01>
- Tchobanov, I., Gal, L., Guilloux-Benatier, M., Remize, F., Nardi, T., Guzzo, J., Serpaggi, V., Alexandre, H., 2008. Partial vinylphenol reductase purification and characterization from *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 284, 213–217. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01192.x>
- Tek, E.L., Sundstrom, J.F., Gardner, J.M., Oliver, S.G., Jiranek, V., 2018. Evaluation of the ability of commercial wine yeasts to form biofilms (mats) and adhere to plastic: implications for the microbiota of the winery environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94, fix188. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix188>
- Timke, M., Wang-Lieu, N.Q., Altendorf, K., Lipski, A., 2008. Identity, beer spoiling and biofilm forming potential of yeasts from beer bottling plant associated biofilms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93, 151–161. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9189-8>
- Torbensen, R., Møller, H.D., Gresham, D., Alizadeh, S., Ochmann, D., Boles, E., Regenber,

- B., 2012. Amino Acid Transporter Genes Are Essential for *FLO11*-Dependent and *FLO11*-Independent Biofilm Formation and Invasive Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 7, e41272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041272>
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., Nomura, N., 2016. Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 7–12. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>
- Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., Tourdot-Maréchal, R., 2020. Microbial dynamics between yeasts and acetic acid bacteria in kombucha: impacts on the chemical composition of the beverage. *Foods* 9, 963. <https://doi.org/10.3390/foods9070963>
- Tran, T., Grandvalet, C., Winckler, P., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., Tourdot-Maréchal, R., 2021. Shedding light on the formation and structure of kombucha biofilm using two-photon fluorescence microscopy. *Front. Microbiol.* 12, 725379. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.725379>
- Tristezza, M., Lourenço, A., Barata, A., Brito, L., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2010. Susceptibility of wine spoilage yeasts and bacteria in the planktonic state and in biofilms to disinfectants. *Ann. Microbiol.* 60, 549–556. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0085-5>
- Tristezza, M., Tufariello, M., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G., Grieco, F., 2016. The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production. *Front. Microbiol.* 7, 670. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00670>
- Tubia, I., Paredes, J., Pérez-Lorenzo, E., Arana, S., 2018a. *Brettanomyces bruxellensis* growth detection using interdigitated microelectrode based sensors by means of impedance analysis. *Sensors Actuators, A Phys.* 269, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2017.11.009>
- Tubia, I., Prasad, K., Pérez-Lorenzo, E., Abadín, C., Zumárraga, M., Oyanguren, I., Barbero, F., Paredes, J., Arana, S., 2018b. Beverage spoilage yeast detection methods and control technologies: A review of *Brettanomyces*. *Int. J. Food Microbiol.* 283, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.020>
- Türkel, S., Korukluoğlu, M., Yavuz, M., 2014. Biocontrol Activity of the Local Strain of

- Metschnikowia pulcherrima* on Different Postharvest Pathogens. *Biotechnol. Res. Int.* 2014, 397167. <https://doi.org/10.1155/2014/397167>
- Umiker, N.L., Descendo, R.A., Lee, J., Edwards, C.G., 2013. Removal of *Brettanomyces bruxellensis* from red wine using membrane filtration. *J. Food Process. Preserv.* 37, 799–805. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00702.x>
- Uppuluri, P., Chaturvedi, A.K., Srinivasan, A., Banerjee, M., Ramasubramaniam, A.K., Köhler, J.R., Kadosh, D., Lopez-Ribot, J.L., 2010a. Dispersion as an Important Step in the *Candida albicans* Biofilm Developmental Cycle. *PLoS Pathog.* 6, e1000828. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>
- Uppuluri, P., Pierce, C.G., Thomas, D.P., Bubeck, S.S., Saville, S.P., Lopez-Ribot, J.L., 2010b. The Transcriptional Regulator Nrg1p Controls *Candida albicans* Biofilm Formation and Dispersion. *Eukaryot. Cell* 9, 1531–1537. <https://doi.org/10.1128/EC.00111-10>
- Váchová, L., Štović, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Štěpánek, L., Kubínová, L., Palková, Z., 2011. Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *J. Cell Biol.* 194, 679–687. <https://doi.org/10.1083/jcb.201103129>
- Valdetara, F., Škalič, M., Fracassetti, D., Louw, M., Compagno, C., du Toit, M., Foschino, R., Petrovič, U., Divol, B., Vigentini, I., 2020. Transcriptomics unravels the adaptive molecular mechanisms of *Brettanomyces bruxellensis* under SO₂ stress in wine condition. *Food Microbiol.* 90, 103483. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103483>
- Vally, H., Misso, N.L.A., Madan, V., 2009. Clinical effects of sulphite additives. *Clin. Exp. Allergy* 39, 1643–1651. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x>
- Van der Walt, J.P., Van Kerken, A.E., 1960. The wine yeasts of the Cape. *Antonie Van Leeuwenhoek* 26, 292–296. <https://doi.org/10.1007/BF02539015>
- Van Leeuwen, C., 2015. L'augmentation du pH des moûts et des vins, un facteur important de développement de *Brettanomyces*, in: 13e Matinée Des OEnologues de Bordeaux. Université de Bordeaux, Bordeaux, France.
- Van Nguyen, P., Plocek, V., Váchová, L., Palková, Z., 2020. Glucose, Cyc8p and Tup1p regulate biofilm formation and dispersal in wild *Saccharomyces cerevisiae*. *npj Biofilms Microbiomes* 6, 7. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0118-1>
- van Rijswijck, I.M., Dijksterhuis, J., Wolkers-Rooijackers, J.C., Abee, T., Smid, E.J., 2014.

- Nutrient limitation leads to penetrative growth into agar and affects aroma formation in *Pichia fabianii*, *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 32, 89–101. <https://doi.org/10.1002/yea.3050>
- van Wyk, S., Farid, M.M., Silva, F.V.M., 2018. SO₂, high pressure processing and pulsed electric field treatments of red wine: Effect on sensory, *Brettanomyces* inactivation and other quality parameters during one year storage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 48, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.016>
- van Wyk, S., Silva, F.V.M., 2017a. High pressure processing inactivation of *Brettanomyces bruxellensis* in seven different table wines. *Food Control* 81, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.028>
- van Wyk, S., Silva, F.V.M., 2017b. High pressure inactivation of *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Microbiol.* 63, 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.020>
- van Wyk, S., Silva, F.V.M., Farid, M.M., 2019. Pulsed electric field treatment of red wine: Inactivation of *Brettanomyces* and potential hazard caused by metal ion dissolution. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 52, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.11.001>
- Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., Delvaux, F.R., 2008. Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chem.* 107, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.008>
- Vandermeulen, M.D., Cullen, P.J., 2020. New Aspects of Invasive Growth Regulation Identified by Functional Profiling of MAPK Pathway Targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 216, 95–116. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303369>
- Varela, C., Bartel, C., Onetto, C., Borneman, A., 2020. Targeted gene deletion in *Brettanomyces bruxellensis* with an expression-free CRISPR-Cas9 system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 7105–7115. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10750-5>
- Verstrepen, K.J., Klis, F.M., 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.* 60, 5–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x>
- Vigentini, I., De Lorenzis, G., Picozzi, C., Imazio, S., Merico, A., Galafassi, S., Piškur, J., Foschino, R., 2012. Intraspecific variations of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* genome studied by capillary electrophoresis separation of the intron splice site profiles. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.017>

- Vigentini, I., Lucy Joseph, C.M., Picozzi, C., Foschino, R., Bisson, L.F., 2013. Assessment of the *Brettanomyces bruxellensis* metabolome during sulphur dioxide exposure. *FEMS Yeast Res.* 13, 597–608. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12060>
- Vigentini, I., Picozzi, C., Foschino, R., 2011. Intron splice site PCR analysis as a tool to discriminate *Dekkera bruxellensis* strains. *Ann. Microbiol.* 61, 153–157. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0110-8>
- Vigentini, I., Romano, A., Compagno, C., Merico, A., Molinari, F., Tirelli, A., Foschino, R., Volonterio, G., 2008. Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. *FEMS Yeast Res.* 8, 1087–1096. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00395.x>
- Villalba, M.L., Susana Sáez, J., del Monaco, S., Lopes, C.A., Sangorrín, M.P., 2016. TdKT, a new killer toxin produced by *Torulasporea delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 217, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.006>
- Vinod, P.K., Sengupta, N., Bhat, P.J., Venkatesh, K. V., 2008. Integration of Global Signaling Pathways, cAMP-PKA, MAPK and TOR in the Regulation of *FLO11*. *PLoS One* 3, e1663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001663>
- Virdis, C., Sumbly, K., Bartowsky, E., Jiranek, V., 2021. Lactic acid bacteria in wine: technological advances and evaluation of their functional role. *Front. Microbiol.* 11, 612118. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612118>
- von Cosmos, N., Edwards, C., 2016. Use of Nutritional Requirements for *Brettanomyces bruxellensis* to Limit Infections in Wine. *Fermentation* 2, 17. <https://doi.org/10.3390/fermentation2030017>
- Warena, A.J., Kauffman, S., Sherrill, T.P., Becker, J.M., Konopka, J.B., 2003. *Candida albicans* Septin Mutants Are Defective for Invasive Growth and Virulence. *Infect. Immun.* 71, 4045–4051. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.4045-4051.2003>
- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J., 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 1474–1479. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.010>
- Weerasekera, M.M., Wijesinghe, G.K., Jayarathna, T.A., Gunasekara, C.P., Fernando, N., Kottegoda, N., Samaranayake, L.P., 2016. Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. *Mem. Inst.*

- Oswaldo Cruz 111, 697–702. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160294>
- Wenning, M., Scherer, S., 2013. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7111–7120. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5087-3>
- White, J.S., Walker, G.M., 2011. Influence of cell surface characteristics on adhesion of *Saccharomyces cerevisiae* to the biomaterial hydroxylapatite. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99, 201–209. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9477-6>
- Wijsman, M.R., van Dijken, J.P., van Kleeff, B.H.A., Scheffers, W.A., 1984. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). *Antonie Van Leeuwenhoek* 50, 183–192. <https://doi.org/10.1007/BF00400180>
- Wikén, T., Scheffers, W.A., Verhaar, A.J.M., 1961. On the existence of a negative pasteur effect in yeasts classified in the genus *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. *Antonie Van Leeuwenhoek* 27, 401–433. <https://doi.org/10.1007/BF02538468>
- Wongsuk, T., Pumeesat, P., Luplertlop, N., 2016. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *J. Basic Microbiol.* 56, 440–447. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500759>
- Woolfit, M., Rozpędowska, E., Piškur, J., Wolfe, K.H., 2007. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukaryot. Cell* 6, 721–733. <https://doi.org/10.1128/EC.00338-06>
- Yang, L., Zheng, C., Chen, Y., Ying, H., 2018. FLO Genes Family and Transcription Factor *MIG1* Regulate *Saccharomyces cerevisiae* Biofilm Formation During Immobilized Fermentation. *Front. Microbiol.* 9, 1860. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01860>
- Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Fancello, F., Zara, S., 2020. Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 134. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02911-5>
- Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Zara, S., 2011. Air-liquid biofilm formation is dependent on ammonium depletion in a *Saccharomyces cerevisiae* flor strain. *Yeast* 28, 809–814. <https://doi.org/10.1002/yea.1907>
- Zara, S., Bakalinsky, A.T., Zara, G., Pirino, G., Demontis, M.A., Budroni, M., 2005. Model for

- Air-Liquid Interfacial Formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2934–2939. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2934>
- Zara, S., Gross, M.K., Zara, G., Budroni, M., Bakalinsky, A.T., 2010. Ethanol-Independent Biofilm Formation by a Flor Wine Yeast Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4089–4091. <https://doi.org/10.1128/AEM.00111-10>
- Zaragoza, O., Gancedo, J.M., 2000. Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signalling. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78, 187–194. <https://doi.org/10.1023/A:1026594407609>
- Zarnowski, R., Westler, W.M., Lacmbouh, G.A., Marita, J.M., Bothe, J.R., Bernhardt, J., Sahraoui, A.L.H., Fontainei, J., Sanchez, H., Hatfeld, R.D., Ntambi, J.M., Nett, J.E., Mitchell, A.P., Andes, D.R., 2014. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio* 5, e01333-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01333-14>
- Zhang, W., Sun, J., Ding, W., Lin, J., Tian, R., Lu, L., Liu, X., Shen, X., Qian, P.-Y., 2015. Extracellular matrix-associated proteins form an integral and dynamic system during *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 40. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00040>
- Zobell, C.E., Allen, E.C., 1933. Attachment of Marine Bacteria to Submerged Slides. *Exp. Biol. Med.* 30, 1409–1411. <https://doi.org/10.3181/00379727-30-6954>
- Zuehlke, J.M., Edwards, C.G., 2013. Impact of Sulfur Dioxide and Temperature on Culturability and Viability of *Brettanomyces bruxellensis* in Wine. *J. Food Prot.* 76, 2024–2030. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-243R>
- Zuehlke, J.M., Petrova, B., Edwards, C.G., 2013. Advances in the Control of Wine Spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 57–78. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182533>
- Zupan, J., Raspor, P., 2010. Invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae* depends on environmental triggers: a quantitative model. *Yeast* 27, 217–228. <https://doi.org/10.1002/yea.1746>
- Zupan, J., Raspor, P., 2008. Quantitative agar-invasion assay. *J. Microbiol. Methods* 73, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.02.009>

Annexes

Annexe 1. Résultats du Phenotype Microarray (Biolog) pour l'oxydation de différentes sources de carbone par différentes souches de *Brettanomyces bruxellensis*. D'après Cibrario, 2017 et Crauwels *et al.*, 2015. Vert = substrat oxydé ; Hachuré = oxydation souche dépendante ; Blanc = substrat non oxydé.

	Compounds	Oxidation
Alcohol Sugars	D-Arabitol, D-Mannitol, Dulcitol, Adonitol	
	Glycerol, m-Erythritol, Xylitol	
	L-Arabitol, myo-Inositol, D-Sorbitol	
Aldoses	D-Arabinose, D-Glucose, D-Mannose, D-Ribose, D-Xylose, L-Arabinose, L-Lyxose	
	D-Galactose, L-Glucose	
	D-Allose	
Amino Acids Metabolism	m-Hydroxy-Phenylacetic acid, Putrescine	
	2-Hydroxy-Benzoic acid, Acetoacetic acid, Citraconic acid, L-Homoserine, Quinic acid, Tyramine, α -Keto-Butyric acid, 4-Hydroxy-Benzoic acid, d-Amino-Valeric acid, N-Acetyl-L-Glutamic acid, p-Hydroxy-Phenylacetic acid, β -Phenylethylamine, γ -Amino-n-Butyric acid	
Amino Acids	D-Alanine, L-Glutamic acid, L-Lysine, L-Methionine, L-Proline	
	L-Aspartic acid	
	D-Threonine, Glycine, L-Alanine, L-Serine, L-Threonine, D-Aspartic acid, D-Serine, L-Arginine, L-Asparagine, L-Glutamine, L-Histidine, L-Isoleucine, L-Leucine, L-Phenylalanine, L-Valine	
Butanoate metabolism	2,3-Butanedione, 2,3-Butanediol, Butyric acid	
	β -Hydroxy-Butyric acid, D,L-Malic acid, γ -Hydroxy-Butyric acid	
Diacid Sugars	L-Tartaric acid	
	Mucic acid	
	D-Saccharic acid, m-Tartaric acid	
Dipeptides	Ala-Gly, Gly-Pro	
	Gly-Asp, Gly-Glu	
Disaccharides	Palatinose	
	Lactose, Lactulose, Melibiose, Sucrose, Trehalose, Cellobiose, Gentiobiose, Maltose, Turanose, 3-O- β -D-Galacto-pyranosyl-D-Arabinose	
	D-Galactonic Acid- γ -Lactone	
Fatty Acid Metabolism	D-Fructose	
	L-Rhamnose, Mannan	
	L-Fucose	
Glutathione Metabolism	L-Pyroglytamic acid	
Glycolysis Metabolites	Oxalomalic acid, Pyruvic acid, Sodium formate	
	D,L- α -Glycerol-Phosphate, D-Glucose-6-Phosphate, Glyoxylic acid	
	D-Fructose-6-Phosphate, Glycolic acid, Oxalic acid	
Ketoses	D-Tagatose	
	L-Sorbose	
Miscellaneous	2-Deoxy-D-Ribose, 3-Hydroxy-2-Butanone, 5-Keto-D-Gluconic acid, Dihydroxy-Acetone, Methyl pyruvate, Sorbic acid	
	D-Lactic acid methyl ester, L-Galactonic Acid- γ -Lactone, Succinamic acid, Tween 40, Tween 80, Amygdalin	
	Bromo-Succinic acid, Caproic acid, Chondroitin sulfate C, D-Citramalic acid, D-Ribono-1,4-Lactone, Gelatine, Itaconic acid, L-Alaninamide, Sebacic acid, Sedoheptulosan, Tricarballic acid, Tween 20, 1,2-Propanediol, Acetamide, Butylamine [sec], D,L-Octopamine, Ethanolamine, L-Hydroxyproline, Mono-Methyl succinate, α -Hydroxy-Glutaric Acid- γ -Lactone, α -Keto-Valeric acid	
	D-Gluconic acid	
	D-Glucuronic acid	
Nucleosides	Adenosine, Inosine, Thymidine, Uridine	
	2'-Deoxy-Adenosine	
Polysaccharides	Dextrin	
	Pectin, Laminarin, Inulin, α -Cyclodextrin, β -Cyclodextrin	
	Glycogen, γ -Cyclodextrin, Stachyose	
Propanoate Metabolism	L-Lactic acid	
	Propionic acid, α -Hydroxy-Butyric acid	
Pyrimidine Metabolism	Malonic acid	
Substituted Monosaccharides	D-Glucosamine, α -Methyl-D-Galactoside, β -Methyl-D-Xylopyranoside	
	Arbutin, α -Methyl-D-Glucoside, β -Methyl-D-Glucoside, Maltitol, N-Acetyl- β -D-Mannosamine, D-Salicin, β -Methyl-D-Galactoside	
	D-Glucosaminic acid, N-Acetyl-D-Galactosamine, N-Acetyl-D-Glucosaminitol, α -D-Glucose-1-Phosphate, β -Methyl-D-Glucuronic acid, α -Methyl-D-Mannoside, 3-O-Methyl-D-Glucose, D-Lactitol, N-Acetyl-D-Glucosamine, N-Acetyl-Neuraminic acid	
	Acetic acid, L-Malic acid	
TCA Cycle Metabolism	α -Keto-Glutaric acid	
	Citric acid, Fumaric acid, Succinic acid	
	Maltotriose, Melezitose	
Trisaccharides	Raffinose	

Annexe 2. Résultats du Phenotype Microarray (Biolog) pour l'oxydation de différentes sources d'azote par différentes souches de *Brettanomyces bruxellensis*. D'après Crauwels *et al.*, 2015. Vert = substrat oxydé ; Hachuré = oxydation souche dépendante ; Blanc = substrat non oxydé.

	Compounds	Oxydation
Amino Acids	L-Alanine, L-Arginine, L-Aspartic acid, L-Glutamic acid, L-Glutamine, L-Isoleucine, L-Leucine, L-Lysine, L-Methionine, L-Phenylalanine, L-Threonine, L-Tyrosine, L-Valine	
	D-Alanine, D-Asparagine, Glycine, L-Asparagine, L-Cysteine, L-Histidine, L-Proline, L-Serine, L-Tryptophan	
	D-Aspartic acid, D-Glutamic acid, D-Lysine, D-Serine, D-Valine	
Arginine/Proline Metabolism	Agmatine, D,L-a-Amino-Caprylic acid, g-Amino-n-Butyric acid, L-Ornithine, Putrescine	
	L-Citrulline, N-Acetyl-L-Glutamic acid	
Dipeptides	Ala-Asp, Ala-Gln, Ala-Gly, Ala-Leu, Ala-Thr, Gly-Gln, Gly-Met, Met-Ala	
	Ala-Glu, Ala-His, Gly-Asn, Gly-Glu	
Histidine Metabolism	Histamine	
Phenylalanine Metabolism	b-Phenylethylamine	
Purine Metabolism	Guanosine, Inosine, Xanthine	
	Adenosine, Cytidine, Guanine, Uric acid	
	Xanthosine	
Pyrimidine Metabolism	Cytidine, Cytosine, Uracil, Uridine	
	Thymidine, Thymine	
Tyrosine Metabolism	Tyramine	
Glutathione Metabolism	L-Pyroglyutamic acid	
Atrazine Degradation	Biuret	
Phosphonate Metabolism	Ethanolamine	
Substituted Monosaccharides	N-Acetyl-b-D-Mannosamine, N-Acetyl-D-Galactosamine, N-Acetyl-D-Glucosamine	
	D-Galactosamine, D-Glucosamine, D-Mannosamine, Glucuronamide	
Miscellaneous	Allantoin, Ammonia, D,L-a-Amino-Caprylic acid, L-Homoserine, Urea	
	Alloxan, D,L-a-Amino-Butyric acid, e-Amino-N-Caproic acid, Ethylamine, L-Norvaline, Sodium nitrate, Sodium nitrite	
	Acetamide, D,L-Lactamide, Ethylenediamine, Formamide, Hydroxylamine, Methylamine, N-Amylamine, N-Butylamine, N-Phthaloyl-L-Glutamic acid, Parabanic acid	



Titre : Caractérisation du mode de vie biofilm chez la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis*

Mots clés : *Brettanomyces bruxellensis*, adhésion, biofilm, diversité intraspécifique, morphologie, invasion

Résumé : La gestion des contaminations par la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis* est un véritable défi pour la filière viti-vinicole. Le mode de vie biofilm, connu pour accroître la résistance des micro-organismes et permettre leur persistance dans l'environnement, est une stratégie pouvant être adoptée par *B. bruxellensis*.

Dans ce projet de thèse, des observations microscopiques ont permis de mettre en évidence la présence de matrice autour des cellules, un élément essentiel de la définition d'un biofilm. L'étude a également révélé que différents morphotypes sont impliqués dans la structure du biofilm, en particulier des filaments formant un véritable réseau. Des chlamydospore-like jusque-là jamais décrites chez l'espèce *B. bruxellensis*, ont été observées au sein du biofilm mais également dans des cultures planctoniques. La production de tels éléments pourrait être une stratégie de la levure pour mieux persister dans les environnements stressants. Des différences notables dans la quantité de cellules adhérentes ont été observées en fonction de la nature des supports et des milieux utilisés, démontrant l'impact de l'environnement sur la formation de biofilm chez *B. bruxellensis*. En particulier, l'absence de glucose semble diminuer la capacité d'adhésion de plusieurs souches de *B. bruxellensis*.

De plus, l'invasion de gélose chez *B. bruxellensis* nouvellement décrite au cours de ce travail se caractérise par le développement de structures multicellulaires diverses à l'intérieur du milieu gélosé, composées notamment de filaments. L'analyse optimisée à travers un pipeline d'acquisition et de traitement d'images révèle que la présence de glucose et d'oxygène favorise l'invasion de gélose. *B. bruxellensis* semble également capable de former des structures biofilm-like telles que des biofilms air-liquide et des colonies complexes.

Enfin, les capacités d'adhésion, de formation de biofilm et d'invasion semblent souche dépendantes, étayant les connaissances à propos de l'importante diversité intraspécifique chez *B. bruxellensis*. Deux méthodologies rapides et fiables ont été adaptées afin de discriminer des souches au sein de groupes génétiques précédemment définis : un protocole de RAPD-PCR et un outil de deep learning. Ce dernier se base sur la diversité de morphologie cellulaire pour prédire le groupe génétique d'un isolat avec une précision de 96,6%. Cette approche nouvelle ouvre la voie pour la mise en place de méthodes de routine simples et accessibles aux acteurs de la filière viti-vinicole pour la prévention des risques de contamination par *B. bruxellensis*.

Title: Characterization of the biofilm mode of life in the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*

Keywords: *Brettanomyces bruxellensis*, adhesion, biofilm, intraspecific diversity, morphology, invasion

Abstract: The management of contamination by the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* is a real challenge for the wine industry. The biofilm mode of life, known to increase the resistance of micro-organisms and to allow their persistence in the environment, is a strategy that can be adopted by *B. bruxellensis*.

In this thesis project, microscopic observations revealed the presence of matrix around the cells, an essential element in the definition of a biofilm. The study also revealed that different morphotypes are involved in the structure of the biofilm, in particular filaments forming a network. Chlamydospore-like elements, never described before in *B. bruxellensis*, were observed within the biofilm but also in planktonic cultures. The production of such elements could be a strategy of the yeast to better persist in stressful environments. Significant differences in the amount of adhered cells were observed depending on the nature of the supports and media used, demonstrating the impact of the environment on biofilm formation in *B. bruxellensis*. In particular, the absence of glucose seems to decrease the adhesion capacity of several *B. bruxellensis* strains.

In addition, agar invasion in *B. bruxellensis* newly described in this work is characterised by the development of diverse multicellular structures within the agar medium, composed notably of filaments. Optimised analysis through an image acquisition and processing pipeline revealed that the presence of glucose and oxygen favours agar invasion. *B. bruxellensis* also appears to be able to form biofilm-like structures such as air-liquid biofilms and complex colonies.

Finally, the adhesion, biofilm formation and invasion abilities appear to be strain dependent, supporting the knowledge about the high intraspecific diversity in *B. bruxellensis*. Two rapid and reliable methodologies were adapted to discriminate strains within previously defined genetic groups: a RAPD-PCR protocol and a deep learning tool. The latter is based on the diversity of cell morphology to predict the genetic group of an isolate with an accuracy of 96.6%. This new approach opens the way for the implementation of simple routine methods accessible to the wine industry for the prevention of *B. bruxellensis* contamination risks.