

Biofilms positifs bactériens pour la maîtrise de *Brettanomyces*

Le travail présent a été réalisé par *Florencia Oviedo* étudiante en Master 2 international *Microbiology and Physicochemistry for food and wine Processes (MP2)* au sein de l'UMR PAM et du laboratoire VALMiS sous la direction des Dr Sandrine Rousseaux et Dr Stéphanie Weidmann-Desroche.

Ce travail a été financé pour le fonctionnement du stage par le Fond de dotation des Œnologues de France et par la Chaire UNESCO Culture et Traditions du Vin pour le financement de l'indemnité de stage.

Résumé

Brettanomyces bruxellensis est une levure d'altération responsable de la production de composés engendrant des défauts organoleptiques dans le vin et entraînant ainsi des pertes qualitative et économique. Habituellement, l'ajout de dioxyde de soufre est principalement utilisé pour contrôler sa prolifération, mais la demande croissante des consommateurs pour des produits à faibles intrants nécessite d'explorer de nouvelles alternatives. Les bactéries lactiques sont utilisées depuis de nombreuses années comme moyen de protéger les aliments. Dans le cas du vin, les bactéries lactiques, le plus souvent *Oenococcus oeni*, sont responsables de la transformation de l'acide malique en acide lactique. L'objectif du présent travail est d'étudier l'interaction entre *B. bruxellensis* et *O. oeni*, en milieu gélosé et dans le vin. Différents temps et concentrations ont été testés, et après 11 jours de croissance d'une souche d'*O. oeni* à des populations supérieures à 10^6 CFU/mL, une inhibition de la croissance de deux souches de *B. bruxellensis* a été obtenue. Ensuite, des biofilms mixtes dans du vin standardisé supplémenté en acide *p*-coumarique ont été réalisés sur des coupons d'acier inoxydable, avec une souche de *O. oeni* et une de *B. bruxellensis*. Les cellules planctoniques et les cellules adhérentes ont été quantifiées par dénombrement sur milieux gélosés et cytométrie en flux. La dégradation de l'acide *p*-coumarique a été également suivie. La présence de *O. oeni* diminue le taux de croissance des cellules planctoniques de *B. bruxellensis* après 14 jours. De même la quantité de cellules adhérentes de *B. bruxellensis* est également affectée par la présence de *O. oeni*. En revanche, la détection de phénols volatils est observée en monoculture et coculture sans différence entre les 2 modalités.

1. Introduction

Les bactéries lactiques (BL) sont un groupe de bactéries gram positives ayant la capacité de fermenter le sucre et de le transformer en acide lactique et autres sous-produits. Ces bactéries ont été historiquement utilisées pour conserver les aliments, notamment grâce à leurs capacités acidifiantes, et sont présentes dans le microbiote humain. Aujourd'hui, avec les nouvelles tendances à limiter les procédés mécaniques et chimiques de conservation des aliments, les BL sont réapparues comme un moyen de prévenir la prolifération de micro-organismes d'altération ou pathogènes. Le vin est un milieu complexe où cohabitent différents microorganismes, responsables de la transformation du moût de raisin en vin, tels que la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les bactéries lactiques telles que *Oenococcus oeni*. Cependant, certains micro-organismes indésirables sont également présents, notamment *Brettanomyces bruxellensis*, levure décrite comme responsable de la production de composés engendrant des défauts

organoleptiques dans le vin. Récemment, la capacité de *B. bruxellensis* à former un biofilm a été décrite. Ce mode de vie pourrait lui conférer une résistance à certains procédés antimicrobiens, expliquant en partie sa persistance en cuveries et en caves. Dans ce travail de synthèse, nous présenterons le principal mécanisme connu des BL pouvant inhiber la croissance de micro-organismes indésirables et leur application possible pour contrôler les levures d'altération dans le vin, afin d'étudier plus en avant l'effet possible sur *B. bruxellensis*.

1.1 Bactéries lactiques en tant que protecteurs

Les bactéries lactiques (LB) ont été largement utilisées dans l'industrie alimentaire tout au long de l'histoire de l'humanité. Le cas le plus courant est probablement la fermentation du lait en une matrice plus stable par la consommation de sucres et l'acidification du milieu (Widyastuti et al., 2014). La protection des BL vis-à-vis de la croissance d'autres microorganismes a été attribuée à différents facteurs. Tout d'abord, leur capacité à acidifier le milieu a été largement attribuée au contrôle des microorganismes moins résistants à l'acidité (Reis et al., 2012). D'autre part, la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, de bactériocines et la compétition pour les nutriments sont également attribuées aux BL.

1.1.1 Production d'acides organiques par les BL

Le principal composant dérivé de la fermentation du sucre par les BL est l'acide lactique, cependant, d'autres acides organiques peuvent être trouvés comme produit final de différentes voies métaboliques, comme l'acide acétique et l'acide propionique (Reis et al., 2012 ; Dagnas et al., 2015). Les BL sont divisées en trois groupes principaux en fonction de leur métabolisme des hexoses. Dans le métabolisme homofermentaire, les BL dégradent les hexoses en produisant de l'acide lactique et de l'ATP, tandis que les BL hétérofermentaires forment du lactate, de l'éthanol ou de l'acétate et du dioxyde de carbone en métabolisant les hexoses. Enfin les hétérofermentaires facultatives peuvent passer par les voies hétérofermentaires ou homofermentaires, selon le type de sucre disponible dans le milieu. (Basso et al., 2014).

La principale action d'inhibition des acides organiques produits par les BL serait liée à la capacité à diminuer le pH intracellulaire des microorganismes d'altération ou pathogènes, mais elle pourrait aussi avoir un effet sur la stabilité des membranes et l'accumulation des anions toxiques (Dagnas et al., 2015). Dans le travail de Narendranath et al. (2001), la concentration minimale inhibitrice de l'acide lactique et de l'acide acétique a été testée pour deux souches de *S. cerevisiae*. Ainsi l'acide acétique avait une concentration minimale inhibitrice plus faible (0,6% p/v) que l'acide lactique (2,5% p/v). Cependant, le pH du milieu peut avoir un impact important sur la toxicité des acides, puisque la forme non dissociée de l'acide pénètre plus facilement la membrane. L'acide lactique a un pKa = 3,86, tandis que l'acide acétique a un pKa = 4,74, ce qui signifie qu'il a une forme plus dissociée à un pH plus élevé et qu'il est plus toxique à un pH plus élevé que l'acide lactique (Narendranath et al., 2001 ; Reis et al., 2012). Cela pourrait représenter une grande variabilité de la performance d'inhibition de ces acides lorsqu'ils sont comparés dans des matrices à faible pH, comme le vin, dont le pH fluctue généralement entre 3,00 et 4,00.

1.1.2 Population de BL dans le vin

Les bactéries lactiques sont largement présentes dans le vin et réalisent la fermentation malolactique (FML), qui transforme l'acide L-malique en acide L-lactique, désacidifiant le vin et contribuant ainsi à la saveur et l'augmentation de la stabilisation microbienne du vin. Cette fermentation se produit généralement après que la fermentation alcoolique ait été réalisée par

des levures, le plus souvent *S. cerevisiae*. Les genres de BL que l'on peut trouver naturellement dans le vin sont *Lactiplantibacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Pediococcus* (Ribéreau-Gayon 2006). La population de BL dans le vignoble est généralement faible et est réduite à la surface des raisins et des feuilles et les populations sont rarement supérieures à 10^3 UFC/g. Cependant, cette population diminue au fur et à mesure que la fermentation alcoolique progresse, avec des valeurs atteignant 10^2 UFC/g et n'augmente à nouveau que lorsque la fermentation alcoolique s'achève (du Toit et al., 2011 ; Ribéreau-Gayon 2006). Même si plusieurs espèces de BL peuvent être trouvées dans les différentes étapes de la vinification, il est bien connu que *Oenococcus oeni* tend à prédominer car cette bactérie montre une plus grande résistance aux conditions défavorables, telles qu'un pH faible, la teneur en alcool et/ou la présence de dioxyde de soufre (Ruiz et al., 2010). Dans le travail de Diez-Ozaeta et al. (2019), malgré la présence de différents genres de BL dans le moût et dans les premières étapes de la FML spontanée, à la fin de la FML, seul *O. oeni* a pu être isolé.

1.2. *Brettanomyces bruxellensis*

Brettanomyces spp. est une levure d'altération bien connue dans le vin. Elle présente la capacité à transformer des acides hydroxycinnamiques, comme l'acide *p*-coumarique, l'acide férulique et l'acide caféique, en 4-éthylphénol (4EP) et 4-éthylgâïacol (4EG), qui sont des composés aromatiques associés à une odeur de cheval, d'animal ou de médicament. (Chatonnet et al., 1992 ; Steensels et al., 2015). Ceci est possible grâce à l'action de deux enzymes, la cinnamate décarboxylase et la vinylphénol réductase (Chatonnet et al., 1992). Même si le genre *Brettanomyces* comporte 5 espèces différentes, *Brettanomyces bruxellensis* est l'espèce retrouvée le plus souvent dans le vin (Wedral et al., 2010). *B. bruxellensis* est très adaptée aux conditions du vin, résistant à une teneur élevée en éthanol, un pH faible, une faible concentration en sucre, une faible teneur en azote et, dans une certaine mesure, au dioxyde de soufre (Sturm et al., 2014 ; Longin et al., 2016a ; Avramova et al., 2018 ; Pinto et al., 2020). En outre, elle est capable d'utiliser différentes sources de carbone, dont l'éthanol, ce qui en fait une levure difficile à éradiquer (Conterno et al., 2006).

1.2.1 Biofilm de *B. bruxellensis*

Récemment, la capacité de *B. bruxellensis* à former un biofilm a été décrite (Lebleux et al., 2020 ; Dimopoulou et al., 2021). Un biofilm est la capacité des microorganismes à s'organiser en structures 3D en produisant des substances polymériques extracellulaires (EPS) permettant l'attachement à des surfaces biotiques ou abiotiques (Alvarez-Ordóñez et al., 2019 ; Azaredo et al., 2017 ; Rumbaugh et al., 2020). Les EPS sont une combinaison de polysaccharides, de protéines, de glycoprotéines, de glycolipides et d'ADN extracellulaire qui confèrent des avantages d'adaptation pouvant améliorer la survie du micro-organisme lorsqu'il est exposé à différents traitements antimicrobiens (Linalou et al., 2020 ; Dimopoulou et al., 2021). Les mécanismes par lesquels la formation de biofilm est favorisée ne sont toujours pas clairement identifiés et peu documentés pour *B. bruxellensis*.

Une étude récente (Lebleux et al., 2020) illustre la capacité de plusieurs souches de *B. bruxellensis* à former un biofilm. Même si toutes les souches testées étaient capables de former des biofilms sur coupons d'acier inoxydable, ces capacités étaient dépendantes de la souche et variaient en fonction du milieu de croissance utilisé, dans ce cas entre le milieu de croissance (YPD) et le vin. Après 7 jours, différentes épaisseurs de biofilm, différentes populations attachées à la surface (UFC/cm²) et différentes morphologies ont été observées (Lebleux et al. 2021).

1.2. *Brettanomyces bruxellensis* versus *Oenococcus oeni*

Peu de choses sont connues sur la façon dont les BL peuvent inhiber la croissance de *B. bruxellensis*. Seules quelques études se sont penchées sur cette question et n'ont observé aucun impact de la présence des BL ou de leurs métabolites produits après la FML (Chescheir et al., 2015 ; Madsen et al., 2016). La plupart des études concernant les BL et *B. bruxellensis*, sont liées à la réduction du temps de réalisation de la FML afin de réduire la fenêtre de contamination de *B. bruxellensis*, notamment par la coinoculation de BL et de levures au début de la FA (Bebegal et al., 2017) (préconisations OIV). Cependant, certaines BL ont montré une certaine activité contre la levure, en particulier *S. cerevisiae*, et il pourrait donc exister un antagonisme entre certaines BL et *B. bruxellensis*.

Ainsi au cours de ce travail, les principaux objectifs ont été (i) d'évaluer l'inhibition de 2 souches de *O. oeni* sur 2 souches de *B. bruxellensis*, (ii) d'évaluer la croissance de co-cultures des deux microorganismes au cours de la formation de biofilms en vin ainsi que la capacité de production de 4EP.

2. Matériel et méthodologie

2.1 Souches et milieux de culture

Deux souches de *Oenococcus oeni*, S et B de la collection de l'Institut de la Vigne et du Vin, Université de Bourgogne, Dijon, France ont été sélectionnées. Les bactéries ont été cultivées dans du milieu MRS modifié, appelé MRSm : 50 g/L de MRS à faible pH (Condalab, Madrid, Espagne), 10 g/L de fructose et 4 g/L d'acide L-malique (Sigma, St Louis, USA).

Deux souches de *Brettanomyces bruxellensis* ont été sélectionnées à partir des travaux de Lebleux et al. (2020) (matériel de cave à vin, France), à savoir les souches 11 et 14. Les souches ont été cultivées en milieu YPD : (0,5% p/v d'extrait de levure (Biokar, Beauvais, France), 1% p/v de bactopectone (Biokar), 2% p/v de D-glucose (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) et 0,02% p/v de chloramphénicol (Sigma, St Louis, USA)).

La souche commerciale *Saccharomyces cerevisiae* Levulia® PN (AEB, Italie) a été utilisée pour la réalisation du vin standardisé.

2.2 Vin standardisé

Un jus de raisin rouge commercial (Casino™, France) a été inoculé avec 1% d'une culture de *S. cerevisiae* et inoculé à 28°C. Des mesures de la densité ont été effectuées à l'aide de l'appareil OenoFoss™. Une fois la densité constante, le vin obtenu a été stérilisé par filtration à travers une membrane de 0,22 µm (Millipore® Masschusetts, USA). Les paramètres œnologiques (alcool, acide malique et sucre résiduel) ont été mesurés par un kit enzymatique (Biosentec™, France) et les paramètres ont été ajustés à 3 g/L de sucre résiduel avec du saccharose (Sigma, St Louis, USA), 4 g/L d'acide L- Malique (Sigma, St Louis, USA), 12% v/v d'alcool et 3,5 pH. Après correction, le vin a été stérilisé par filtration comme décrit précédemment.

2.3 Adaptation au milieu vin

Les cultures de *O. oeni* et de *B. bruxellensis* ont été adaptées au milieu vin standardisé avant les expérimentations dans ce milieu.

2.4 Tests d'antagonisme en gélose

Ce test sur gélose a été adapté de Prasad et Babu (2017). Une culture en MRSm de *O. oeni* a été striée au milieu d'une boîte de gélose MRSm, en traçant une ligne droite traversant la circonférence de la plaque. Puis, 3 stries perpendiculaires de 10 µL des deux souches de *B. bruxellensis* en MRSm ont été tracées sans toucher la strie précédente de *O. oeni*. Le même processus a été répété, mais en laissant *O. oeni* se développer sur gélose dans des conditions anaérobies pendant 0, 4 et 11 jours avant d'ensemencer *Brettanomyces bruxellensis*. Après l'ensemencement, les boîtes ont été incubées pendant 6 jours à 28°C en conditions aérobies ou jusqu'à ce que des colonies soient visibles.

En parallèle, une culture en MRSm de *O. oeni* a été diluée en série dans de l'eau physiologique jusqu'à obtenir une dilution de 1:10000 (de 10^9 UFC/mL à 10^5 UFC/mL). Les différentes dilutions ont été étalées sur la gélose comme décrit précédemment et laissées cultiver pendant 11 jours en conditions anaérobies à 28°C. Ensuite, 10 µL de culture en milieu MRSm de *B. bruxellensis* ont été ensemencés comme décrit précédemment.

Les essais ont été effectués en 3 répétitions biologiques. Les résultats ont été enregistrés par "l'inhibition visuelle de la croissance" de *B. bruxellensis* par rapport à la taille originale de la strie et l'observation de colonies. Les résultats ont été comparés à un témoin de *B. bruxellensis*.

2.5 Culture dans le vin et en biofilm

Pour évaluer l'interaction entre les deux microorganismes, des monocultures et des cocultures ont été réalisées. Pour cela, 15 ml de vin ont été inoculés avec (i) *O. oeni* souche S, (ii) *O. oeni* souche B, (iii) *B. bruxellensis* souche 11, (iv) *B. bruxellensis* souche 11 et *O. oeni* souche S et (v) *B. bruxellensis* souche 11 et *O. oeni* souche B provenant des cultures précédemment adaptées au vin. Trois répétitions biologiques par modalité ont été réalisées.

Les cultures ont été inoculées pour atteindre une population initiale de 5×10^5 UFC/mL estimée par cytométrie de flux. Pour toutes les cultures, un coupon de 25mm x 25mm en acier inoxydable (Goodfellow, France) a été ajouté pour la formation de biofilm. Les cultures ont été incubées indépendamment pendant 14 jours à 28°C. Des échantillons de vin ont été prélevés à 2, 7 et 14 jours pour être dénombrés sur gélose (MRSm pour *O. oeni* et YPD pour *B. bruxellensis*) et analysés par cytométrie de flux. Les cellules analysées qui ont été prélevées dans le vin seront appelées cellules planctoniques. Pour évaluer les populations adhérentes, les coupons en acier inoxydable ont été prélevés à 2, 7 et 14 jours et lavés dans 15 ml d'eau physiologique. Les cellules ont été détachées du coupon par sonication pendant 5 minutes. Les échantillons ont ensuite été comptés sur gélose et évalués au cytomètre en flux.

2.6 Production 4 EP

De l'acide *p*-coumarique (6 mg/L) a été ajouté aux échantillons de vin standardisé. Après 7 et 14 jours de chaque culture, 2 ml d'échantillons ont été collectés et centrifugés pendant 5 min à 9000 x g. Le surnageant a été collecté et stocké à -20°C pour une analyse ultérieure. Le dosage des 4 EP et 4 EG ont été réalisés par le laboratoire Excell.

2.7 Analyse par cytométrie de flux

Un cytomètre de flux BD Accuri™ CSampler Plus a été utilisé pour dénombrer les populations de *O. oeni* et de *B. bruxellensis*. Le marqueur cFDA a été utilisé pour mesurer l'activité estérase des cellules. Brièvement, 500 µL d'échantillon ont été centrifugés à 9000 x g pendant 5 minutes, et le culot a été remis en suspension dans un tampon PBS 1X et dilué en série jusqu'à obtention d'une gamme optimale d'événements selon les recommandations du fabricant. 100 µL ont ensuite été prélevés et ajoutés à 1 µL de cFDA et laissés pendant 15 minutes dans l'obscurité. Les échantillons ont été analysés par le programme BD CSamples plus. Le cFDA a été analysé par la fluorescence verte correspondant au canal "FITC-A" (533/30 nm). En coculture, les bactéries et les levures ont été discriminées par la valeur de la lumière diffusée et comparées aux profils de monoculture.

2.8 Analyses statistiques

Les populations dénombrées sur milieux gélosés et par cytomètre en flux ont été analysées statistiquement à l'aide du test T de Student en supposant une variance inégale et en considérant une valeur p de 0,05 en utilisant Microsoft Excel. Une Anova à deux facteurs avec une valeur p de 0,05 a été réalisée pour la production de 4 EP et 4EG par Microsoft Excel.

3. Résultats

3.1 Tests d'antagonisme en gélose

Pour évaluer l'interaction entre *B. bruxellensis* et *O. oeni*, des tests d'antagonisme sur gélose ont été réalisés. Les cultures de *O. oeni* souches S et B ($1,2 \times 10^9$ CFU/mL) ont été étalées sur milieu gélosé MRSm, en traçant une ligne droite traversant la circonférence de la plaque. Trois essais différents ont été réalisés : après 0, 4 et 11 jours de croissance de *O. oeni* dans des conditions anaérobies, *Brettanomyces bruxellensis* a été ensemencée. Après ce dernier ensemencement, les boîtes ont été incubées pendant 6 jours à 28°C en conditions aérobies ou jusqu'à ce que des colonies soient visibles.

Après 0 et 4 jours de croissance d'*O. oeni*, aucune inhibition de la croissance de *B. bruxellensis* n'a été observée (données non présentées). Après 11 jours de croissance des souches *O. oeni* S et B, une inhibition de la croissance de *B. bruxellensis* a été observée (croissance limitée par rapport au contrôle, et dans certains cas aucune croissance n'était visible). (Figure 4.)

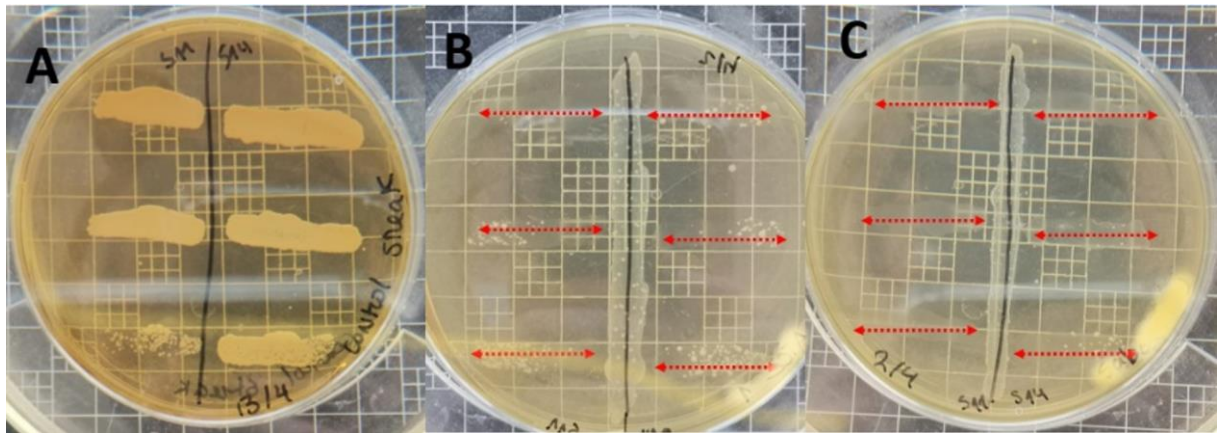


Figure 1 : Tests d'inhibition après 11 jours de croissance de *O. oeni*. (A) Témoin *B. bruxellensis* (MRSm), à gauche la souche 11 et à droite 14. (B) Tests d'inhibition avec la souche B de *O. oeni* et les souches "11" à gauche et "14" à droite. (C) Tests d'inhibition avec la souche S de *O. oeni* avec la souche 11 à gauche et la souche 14 à droite. Les lignes rouges indiquent la taille originale de la strie de *B. bruxellensis*.

Dans un second temps, une culture de la souche S de *O. oeni* ($1,67 \times 10^9$ UFC/mL) a été successivement diluée jusqu'à 1:10000 ((de 10^9 UFC/mL à 10^5 UFC/mL). Après une incubation de 11 jours, des stries des souches 11 et 14 de *B. bruxellensis* ont été réalisées. Après 6 jours d'incubation, une inhibition a été observée pour toutes les dilutions par rapport au contrôle, avec une faible inhibition pour la dilution 10^{-4} correspondant à une concentration de 10^5 UFC/mL (Figure 2).

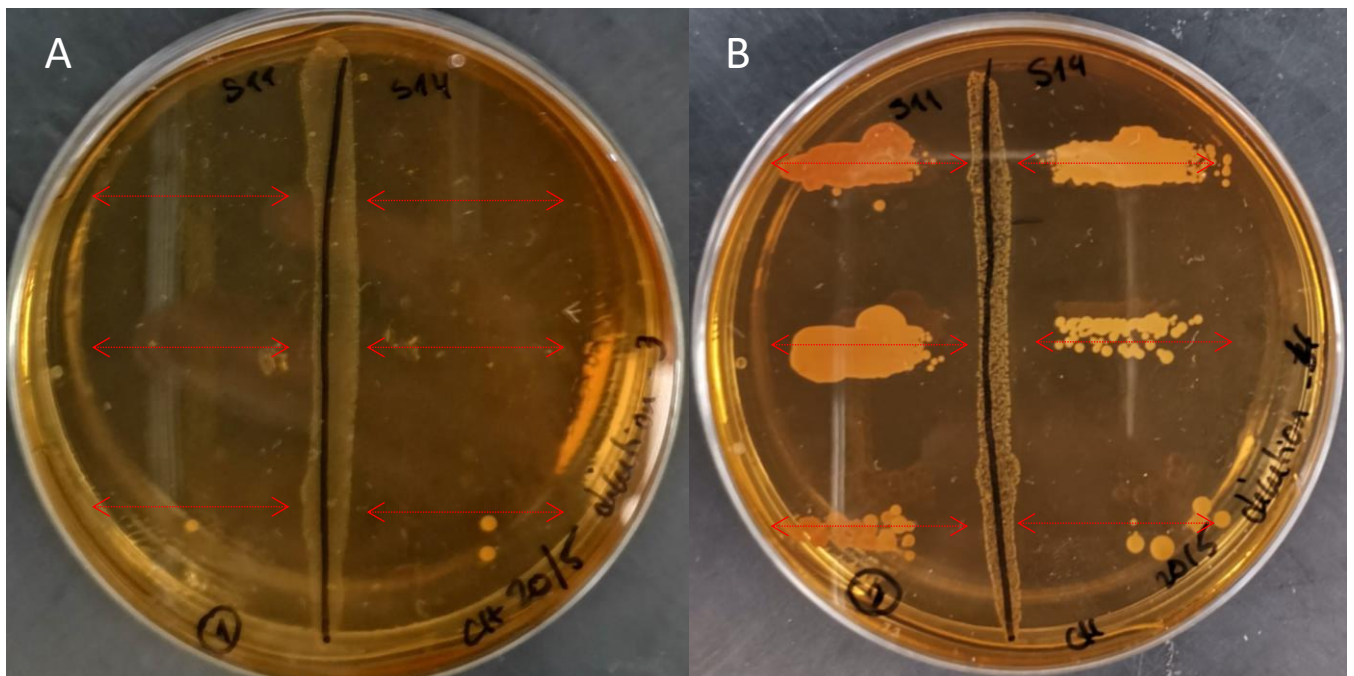


Figure 2 : Tests d'inhibition après 11 jours de croissance de la souche S de *O. oeni*. (A) dilution de la suspension cellulaire de la souche S de *O. oeni* (10^{-3}) avec à gauche la souche 11 et à droite la souche 14. (B) dilution de la suspension cellulaire de la souche S de *O. oeni* (10^{-4}) avec à gauche la souche 11 et à droite la souche 14. Les lignes rouges indiquent la taille originale de la strie de *B. bruxellensis*

3.2 Biofilms mixtes dans le vin

3.2.1 Cytométrie

La souche S de *O. oeni* a été cultivée en biofilm dans du vin avec la souche 11 de *B. bruxellensis*, pendant 2, 7 et 14 jours. Des échantillons ont été prélevés et marqués avec du cFDA (marqueur de viabilité) pour mesurer la population viable totale des deux microorganismes par cytométrie de flux. Des échantillons ont été prélevés à la fois sur coupons d'acier inoxydable (cellules adhérentes) et dans le milieu vin (cellules planctoniques). En parallèle, des monocultures ont été également réalisées, servant de contrôle de culture.

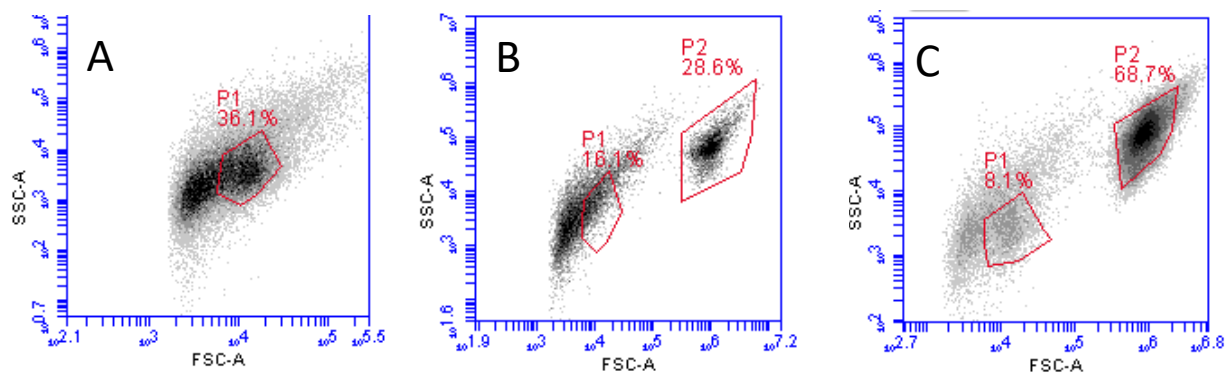


Figure 2 : Observations au cytomètre de *O. oeni* (P1) et de *B. bruxellensis* (P2) par Side Scattered light (SSC-A) et Forward Scattered light (FSC-A). (A) Observation de la monoculture de *O. oeni* dans le vin après 7 jours de croissance. (B) Monoculture de *B. bruxellensis* dans le vin après 7 jours de croissance. (C) Coculture dans le milieu après 7 jours de croissance.

B. bruxellensis est décrite comme présentant des tailles de cellules qui peuvent atteindre 21,71 μm^2 en milieu YPD (Louw et al., 2016), tandis que *O. oeni* présente des cellules ayant une taille d'environ 200-600 nm en milieu FT80 (Wang et al., 2017). Par cytométrie et le programme BC sampler plus (Figure 7), la définition de secteurs de mesure (P1 et P2) a été réalisée au sein de chaque groupe de cellules. Les échantillons ont été marqués avec du cFDA pour quantifier la viabilité des cellules par la présence d'une activité estérase. Les cellules présentant une fluorescence verte (533/30 nm) ont été considérées comme "positives" (marquage cFDA), et appelées par la suite cellules "viables". Les 2 types de micro-organismes sont différenciés par leur taille par cytométrie. Cependant, on observe 2 populations cellulaires pour la levure d'altération décrite comme présentant des formes cellulaires différentes selon le milieu ou l'état physiologique (Louw et al., 2016, Lebleux et al., 2021).

Ensuite, les cellules dites positives pour le cFDA ont été comparées aux dénombrements réalisés sur gélose. Aucune différence statistique n'a été observée entre les dénombrements et les analyses par cytométrie (test T, valeur $p < 0,05$) (données non présentées).

3.2.2 Coculture de *B. bruxellensis* et *O. oeni* dans le vin.

Des cultures de la souche S de *O. oeni* et de la souche 11 *B. bruxellensis* ont été réalisées dans du vin et en présence de coupons en acier inoxydable pour étudier la formation de biofilm. Après 2, 7 et 14 jours, des échantillons ont été collectés et mesurés par cytométrie de flux pour déterminer la concentration de cellules planctoniques et de cellules adhérees sur le coupon. Des monocultures ont été réalisées comme contrôle. Les moyennes et les différences statistiques se trouvent dans l'annexe I.

Pour les cellules planctoniques (Figure 3A), après deux jours, les populations levuriennes ne sont pas statistiquement différentes en mono et coculture : la présence de la bactérie n'a pas d'influence sur la croissance des cellules planctoniques levuriennes. Par contre à 2j, il y a plus de cellules planctoniques bactériennes (statiquement différent) en coculture comparé à la monoculture. A 7j pour les 2 microorganismes il y a plus de cellules planctoniques dans la modalité coculture que dans la modalité monoculture : la présence d'un microorganisme influence la population de l'autre et il y a peut-être un relargage des populations adhérees. A 14j, les populations planctoniques levuriennes et bactériennes sont identiques pour les deux modalités.

Pour les cellules adhérees (Figure 3B), après deux jours, les populations adhérees levuriennes et bactériennes sont identiques pour les deux modalités. A 7j, il y a plus de cellules adhérees de *B. bruxellensis* dans la modalité coculture que dans la modalité monoculture (différence statistique) : la présence de la bactérie semble avoir un effet sur la population levurienne adhéerant au coupon. En présence ou en absence de la levure, les populations bactériennes adhérees sont identiques et ce résultat est observable aussi à 14j. Pour la levure, on observe à 14j une diminution des cellules adhérees au coupon en présence de la bactérie alors qu'en monoculture la population cellulaire augmente.

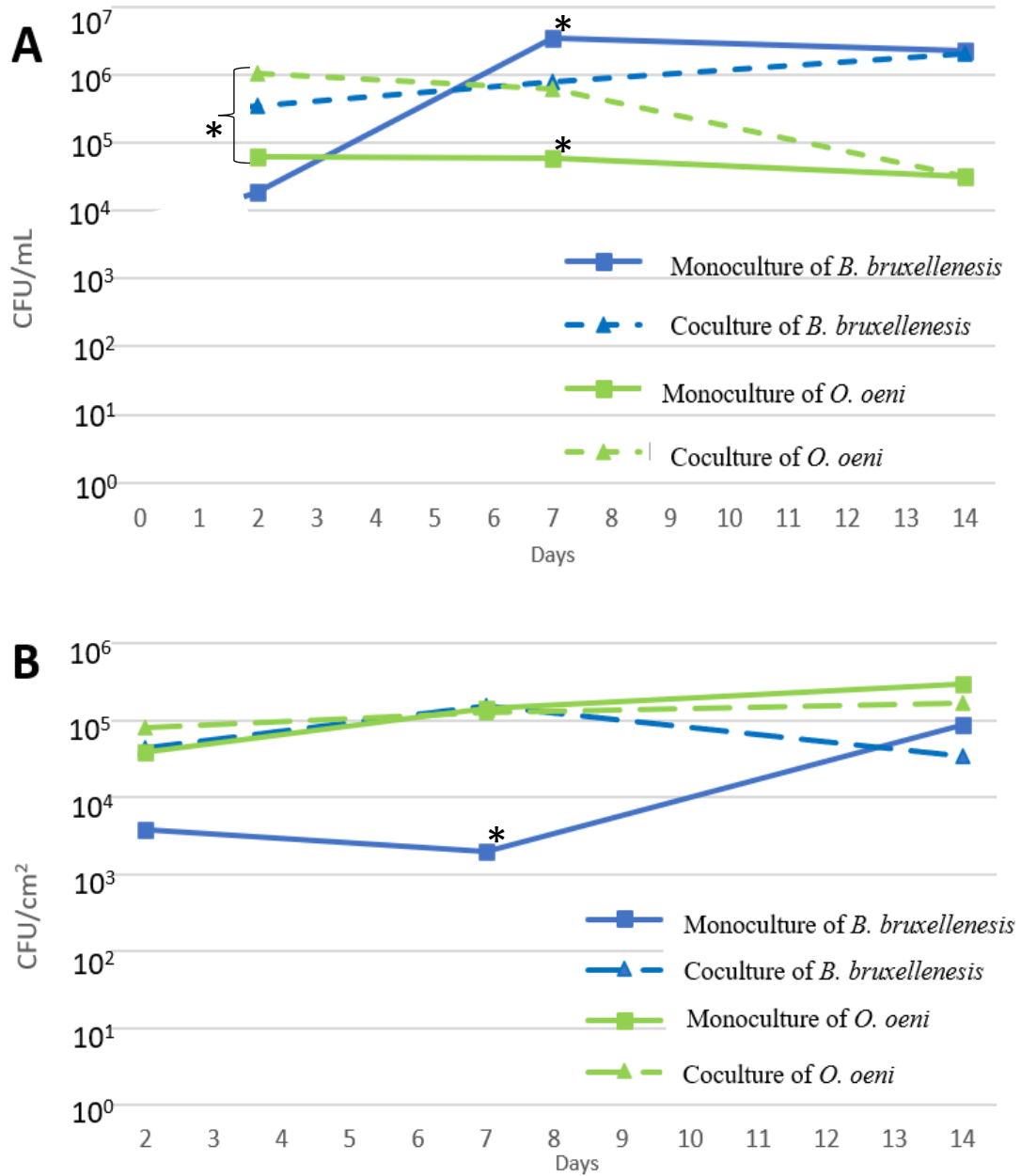


Figure 3. Cellules viables de *B. bruxellensis* en monoculture (bleu trait plein) et en coculture (bleu trait pointillé) et de *O. oeni* en monoculture (vert trait plein) et en coculture (vert trait pointillé) (A) Cellules planctoniques en UFC/mL (B) Cellules adhérentes au coupon en acier inoxydable en UFC/cm². * indication de différences statistiques

3.2.3 Production de 4 éthyl phénol et de 4 éthyl guaiacol

Le 4 EP et 4 EG n'ont pas été détectés pour les monocultures de *O. oeni* ou pour le vin non inoculé (données non présentées). En revanche la souche 11 de *B. bruxellensis* est capable de produire du 4 EP et 4EG. La somme du 4 EP et du 4EG produit a été comparée entre toutes les modalités après 7 et 14 jours. Une forte augmentation des phénols est observée entre 7 et 14 jours (de 2500 µg/L à 4286.6 µg/L). Aucune différence significative n'est observée entre les modalités (Anova deux facteurs, valeur $p < 0,05$) (Figure 4).

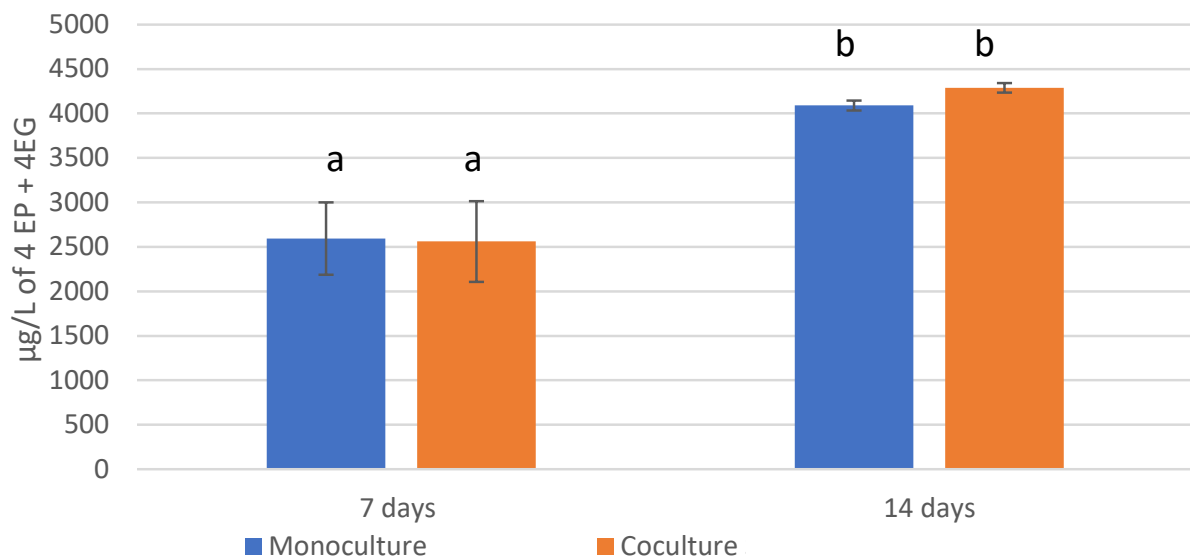


Figure 4 : Production de 4 éthyl guaiacol (4EG) et de 4 éthyl phénol (4EP) en µg/L par la monoculture de la souche 11 de *B. bruxellensis* et la coculture avec la souche S de *O. oeni*. Les valeurs représentent la moyenne des 3 répétitions biologiques pour chaque culture.

4. Discussion

4.1 Interaction entre *B. bruxellensis* et *O. oeni* sur milieu gélosé

Dans ce travail, l'interaction entre *B. bruxellensis* et *O. oeni* sur milieu gélosé a été étudiée. Premièrement, il semble nécessaire pour avoir un effet antagoniste que *O. oeni* se développe une dizaine de jours avant d'inoculer *B. bruxellensis*. Deuxièmement, le niveau de population semble être un facteur important, car après 11 jours de culture, l'inhibition de *B. bruxellensis* obtenue dépend de la quantité de population de la bactérie. Aucun effet de souche n'a été démontré dans cette étude, bien qu'à l'avenir il soit nécessaire d'augmenter le nombre

de souches d'étude. L'acide lactique produit par *O. oeni* pendant la FML pourrait être une molécule candidate pour l'inhibition. L'acide L-lactique a été signalé comme étant capable de réduire la population de levures, telles que *S. cerevisiae* (Bayrock et al., 2004). L'inhibition étant importante au-delà de 10^6 UFC/mL, population nécessaire au démarrage de la fermentation malolactique (Reguant et al., 2005), l'acide lactique pourrait être ainsi considéré comme à l'origine de l'inhibition.

4.2 Validation du cytomètre en flux comme outil de détection des microorganismes

Des cocultures entre les deux microorganismes ont été réalisées afin de mieux déterminer leur interaction dans le vin. Pour cela, nous avons utilisé la cytométrie en flux pour mesurer les concentrations totales et déterminer la viabilité en les marquant avec du cFDA, marqueur qui produit une fluorescence verte lorsqu'il est dissocié par l'action des estérases (Longin et al., 2016b). Dans ce travail, aucune différence significative n'a été observée entre les populations dénombrées sur gélose et par cytométrie. Ainsi la cytométrie en flux peut être considérée comme un outil utile pour la détection des microorganismes du vin.

4.3 Interactions *B. bruxellensis* et *O. oeni* en biofilm et dans le vin

La présence de *B. bruxellensis* semble avoir eu un effet négatif sur la viabilité des cellules planctoniques de *O. oeni* après 14 jours de culture. Lorsqu'une inhibition est observée entre les BL et les levures, les causes possibles sont la libération de métabolites ou l'épuisement des nutriments (Balmaseda et al., 2018). Même si cela pourrait être le cas pour la perte de viabilité, plus d'informations sont nécessaires pour affiner la cause.

Dans des études précédentes, l'adhésion de *O. oeni* a été observée jusqu'à des concentrations de 10^6 UFC/cm² après 6 jours d'incubation. (Bastard et al., 2016 ; Coelho et al., 2019). Par rapport aux résultats de ce travail, une faible adhésion de *O. oeni* a été obtenue pour des périodes d'incubation similaires. Cependant, dans les travaux cités, (i) la population d'inoculation est supérieure à 10^6 UFC/mL, alors que dans ce travail, la population inoculée était au maximum de 10^5 UFC/mL et (ii) les biofilms avaient été réalisées en milieu de culture favorable au développement d'*O. oeni* et non en vin comme dans notre étude. De plus, certaines études ont décrit un effet négatif des polyphénols dans la formation de biofilms pour les bactéries (Huber et al., 2003). En fonction de la matrice vin (cépage...), la concentration et la composition en polyphénols est variable.

Des cellules adhérentes de *B. bruxellensis* ont été dénombrées dans les deux modalités. A titre de comparaison, dans le travail de Lebleux et al. (2020), la population adhérente pour la même souche était de 5.5×10^5 UFC/cm² après 7 jours et 2.4×10^6 UFC/cm² après 14 jours, populations plus élevées que celles dénombrées dans ce travail pour des périodes de temps similaires. De même, que pour la souche de *O. oeni*, nous pouvons supposer qu'un milieu différent affecte l'attachement des cellules et la formation du biofilm. En effet, les profils nutritionnels, la concentration en polyphénols des vins ainsi que d'autres facteurs peuvent varier considérablement et avoir un impact différent.

Pour les monocultures de *B. bruxellensis*, l'adhésion des cellules est faible à 7 jours, cependant, à 14 jours la quantité de cellules adhérentes augmentent de plus de 1 log UFC/cm². Par contre en coculture, la quantité de cellules adhérentes atteint son maximum après 7 jours et diminue pour atteindre le même niveau de cellules adhérentes qu'à 2 jours. Même si les populations à la fin ne sont pas significativement différentes, il est intéressant de noter qu'en monoculture, les cellules adhèrent plus alors qu'en coculture les cellules adhérentes diminuent. Il est intéressant de noter, comme discuté précédemment, que ceci est accompagné d'une augmentation de l'adhésion des cellules de *O. oeni*. Ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une compétition pour le coupon pourrait se produire entre les 2 microorganismes, et que *O. oeni* prenne l'avantage.

En revanche la coculture ne semble pas avoir d'effets sur la production de phénols volatils.

5. Conclusion

Au cours de ce travail, une inhibition de la croissance d'une souche *B. bruxellensis* par une souche de *O. oeni* est suggérée en milieu gélosé. Il semble nécessaire que la bactérie ait atteint un niveau de population ou la capacité à produire des composés pour observer un effet. La vitesse de croissance et l'adhésion de *B. bruxellensis* semblent influencées par la présence de *O. oeni*. D'autres études doivent être menées (i) pour approfondir les connaissances des interactions entre les deux microorganismes et également (ii) explorer l'effet de la coculture sur l'adhésion et la formation de biofilms. Ces résultats préliminaires offrent de nouvelles pistes dans la lutte contre les altérations et plus particulièrement contre *B. bruxellensis*.

6. Références

- Agnolucci, Monica, Francesco Rea, Cristiana Sbrana, Caterina Cristani, Daniela Fracassetti, Antonio Tirelli, and Marco Nuti. (2010). "Sulphur Dioxide Affects Culturability and Volatile Phenol Production by *Brettanomyces/Dekkera Bruxellensis*." *International Journal of Food Microbiology* 143, no. 1–2: 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.022>.
- Alvarez-Ordóñez, Avelino, Laura M. Coughlan, Romain Briandet, and Paul D. Cotter (2019). "Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities." *Annual Review of Food Science and Technology* 10, no. 1 (March 25, 2019): 173–95. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121805>.
- Atanassova, M. (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1–2), 63–73. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00054-0)
- 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. (2018). *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. *Scientific Reports*, 8(1), 4136. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22580-7>
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R. L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., & Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 313–351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
- Balmaseda, A., Bordons, A., Reguant, C., & Bautista-Gallego, J. (2018). Non-Saccharomyces in Wine: Effect Upon *Oenococcus oeni* and Malolactic Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 534. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00534>
- Basso, T. O., Gomes, F. S., Lopes, M. L., de Amorim, H. V., Eggleston, G., & Basso, L. C. (2014). Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(1), 169–177. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0063-6>
- 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. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00613>
- Bayrock, D. P., & Ingledew, W. M. (2004). Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: Nutrient depletion and/or acid toxicity? *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31(8), 362–368. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0156-3>

- Berbegal, C., Spano, G., Fragasso, M., Grieco, F., Russo, P., & Capozzi, V. (2017). Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2), 569–576. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8666-x>
- Chatonnet, Pascal, Denis Dubourdie, Jean-noël Boidron, and Monique Pons. (1992) “The Origin of Ethylphenols in Wines.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60, no. 2 : 165–78. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>.
- Chescheir, S., D. Philbin, and J. P. Osborne. (2015) “Impact of *Oenococcus Oeni* on Wine Hydroxycinnamic Acids and Volatile Phenol Production by *Brettanomyces Bruxellensis*.” *American Journal of Enology and Viticulture* 66, no. 3: 357–62. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.14108>.
- Coelho, C., Gougeon, R. D., Perepelkine, L., Alexandre, H., Guzzo, J., & Weidmann, S. (2019). Chemical Transfers Occurring Through *Oenococcus oeni* Biofilm in Different Enological Conditions. *Frontiers in Nutrition*, 6, 95. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00095>
- Conterno, Lorenza, C M Lucy Joseph, Torey J Arvik, Thomas Henick-Kling, and Linda F Bisson (2006). “Genetic and Physiological Characterization of *Brettanomyces Bruxellensis* Strains Isolated from Wines,” 2006, 10.
- Dagnas S, Gauvry E, Onno B, Membré JM (2015). Quantifying Effect of Lactic, Acetic, and Propionic Acids on Growth of Molds Isolated from Spoiled Bakery Products. *J Food Prot.* 2015 Sep;78(9):1689-98. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-046>.
- Diez-Ozaeta, Iñaki, Félix Amárita, María Lavilla, and Sandra Rainieri. (2019) “Ecology of Indigenous Lactic Acid Bacteria from Rioja Alavesa Red Wines, Focusing on Biogenic Amine Production Ability.” *LWT* 116: 108544. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108544>.
- Dimopoulou, Maria, Vasiliki Kefalloniti, Panagiotis Tsakanikas, Seraphim Papanikolaou, and George-John E. Nychas. (2021) “Assessing the Biofilm Formation Capacity of the Wine Spoilage Yeast *Brettanomyces Bruxellensis* through FTIR Spectroscopy.” *Microorganisms* 9, no. 3: 587. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030587>.
- Du Toit, Maret du, Lynn Engelbrecht, Elda Lerm, and Sibylle Krieger-Weber. (2011) “*Lactobacillus*: The Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures—an Overview.” *Food and Bioprocess Technology* 4, no. 6 (August 2011): 876–906. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0448-8>.
- Gorinstein, Shela, Abraham Caspi, Marina Zemser, and Simon Trakhtenberg.(2000) “Comparative Contents of Some Phenolics in Beer, Red and White Wines.” *Nutrition Research* 20, no. 1: 131–39. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(99\)00145-1](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(99)00145-1).
- Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., & Polster, J. (2003). Influence of Polyphenols on Bacterial Biofilm Formation and Quorum-sensing. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 58(11–12), 879–884. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-11-1224>

- Ibarra-Sánchez, Luis A., Nancy El-Haddad, Darine Mahmoud, Michael J. Miller, and Layal Karam. (2020) "Invited Review: Advances in Nisin Use for Preservation of Dairy Products." *Journal of Dairy Science* 103, no. 3 :2041–52. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17498>.
- Krieger-Weber, S., Heras, J. M., & Suarez, C. (2020). Lactobacillus plantarum, a New Biological Tool to Control Malolactic Fermentation: A Review and an Outlook. *Beverages*, 6(2), 23. <https://doi.org/10.3390/beverages6020023>
- Lebleux, Manon, Hany Abdo, Christian Coelho, Louise Basmaciyan, Warren Albertin, Julie Maupeu, Julie Laurent, et al. (2020) "New Advances on the Brettanomyces Bruxellensis Biofilm Mode of Life." *International Journal of Food Microbiology* 318 : 108464. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464>
- Lebleux, Manon, Deminal Emmanuel, et al. (2020) "Prediction of genetic groups within Brettanomyces bruxellensis through cell morphology using a deep learning tool in press *J. Fungi* 2021, 7, <https://doi.org/10.3390/jof7080581>
- Lianou, Alexandra, George-John E. Nychas, and Konstantinos P. Koutsoumanis. (2020) "Strain Variability in Biofilm Formation: A Food Safety and Quality Perspective." *Food Research International* 137: 109424. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109424>.
- Longin, Cédric, Claudine Degueurce, Frédérique Julliat, Michèle Guilloux-Benatier, Sandrine Rousseaux, and Hervé Alexandre. (2016a) "Efficiency of Population-Dependent Sulfite against Brettanomyces Bruxellensis in Red Wine." *Food Research International* 89: 620–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.019>.
- Longin C, Petitgonnet C, Guilloux-Benatier M, Rousseaux S, Alexandre H. (2016b) Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiol.* 2017 Apr;62:221-231. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.023. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27889152.
- López-Cuellar, Ma. del Rocío, Adriana-Inés Rodríguez-Hernández, and Norberto Chavarría-Hernández. (2016) "LAB Bacteriocin Applications in the Last Decade." *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 30, no. 6: 1039–50. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1232605>.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.040>
- 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. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68(1), 23–29. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.16015>

- Narendranath, N V, K C Thomas, and W M Ingledew (2001). "Effects of Acetic Acid and Lactic Acid on the Growth of *Saccharomyces Cerevisiae* in a Minimal Medium." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, no. 3 171–77. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000090>.
- Narendranath, Neelakantam V., Kolothumannil C. Thomas, and W. Michael Ingledew (2001). "Acetic Acid and Lactic Acid Inhibition of Growth of *Saccharomyces Cerevisiae* by Different Mechanisms." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 59, no. 4 (September 2001): 187–94. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-59-0187>.
- O’Sullivan, L, R.P Ross, and C Hill. (2002) "Potential of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria for Improvements in Food Safety and Quality." *Biochimie* 84, no. 5–6: 593–604. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01457-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01457-8).
- Prasad, A. A., & Babu, S. (2017). Compatibility of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in growth promotion of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 89(2), 1027–1040. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160617>
- Pinto, L., F. Baruzzi, L. Cocolin, and M. Malfeito-Ferreira. (2020) "Emerging Technologies to Control *Brettanomyces* Spp. in Wine: Recent Advances and Future Trends." *Trends in Food Science & Technology* 99 : 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.013>.
- Radler, E. "Possible Use of Nisin in Winemaking (1990). I. Action of Nisin Against Lactic Acid Bacteria and Wine Yeasts in Solid and Liquid Media" 41, no. 1: 6.
- Reis, J. A., A. T. Paula, S. N. Casarotti, and A. L. B. Penna (2012). "Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications." *Food Engineering Reviews* 4, no. 2 (June 2012): 124–40. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>.
- Reguant, C., Carrete, R., Ferrer, N., & Bordons, A. (2005). Molecular analysis of *Oenococcus oeni* population dynamics and the effect of aeration and temperature during alcoholic fermentation on malolactic fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, 40(4), 451–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00946.x>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., & Donèche, B. (2006). *Handbook of enology The Microbiology of Wine and Vinifications* (2nd ed). John Wiley
- Rieger, T. (2018) *Brettanomyces* Economics Survey Seeks More Winery Participants/Feedback. *Winebusiness.com*. <https://www.winebusiness.com/news/?go=getArticle&dataid=203428>
- Ruiz, Patricia, Pedro Miguel Izquierdo, Susana Seseña, and María Llanos Palop. (2010) "Selection of Autochthonous *Oenococcus Oeni* Strains According to Their Oenological Properties and Vinification Results." *International Journal of Food Microbiology* 137, no. 2–3: 230–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.027>.

- Rumbaugh, Kendra P., and Karin Sauer. "Biofilm Dispersion. (2020)" *Nature Reviews Microbiology* 18, no. 10: 571–86. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>.
- Serpaggi, Virginie, Fabienne Remize, Ghislaine Recorbet, Eliane Gaudot-Dumas, Anabelle Sequeira-Le Grand, and Hervé Alexandre. (2012) "Characterization of the 'Viable but Nonculturable' (VBNC) State in the Wine Spoilage Yeast *Brettanomyces*." *Food Microbiology* 30, no. 2 : 438–47. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.020>.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>
- Sturm, M.E., F.N. Arroyo-López, A. Garrido-Fernández, A. Querol, L.A. Mercado, M.L. Ramirez, and M. Combina. (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." *International Journal of Food Microbiology* 170 :83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.019>.
- Tristezza, Mariana, Luca di Feo, Maria Tufariello, Francesco Grieco, Vittorio Capozzi, Giuseppe Spano, Giovanni Mita, and Francesco Grieco. (2016) "Simultaneous Inoculation of Yeasts and Lactic Acid Bacteria: Effects on Fermentation Dynamics and Chemical Composition of Negroamaro Wine." *LWT - Food Science and Technology* 66 : 406–12. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.064>.
- Vally, Hassan, and Philip Thompson. (2003) "Allergic and Asthmatic Reactions to Alcoholic Drinks." *Addiction Biology* 8, no. 1: 3–11. <https://doi.org/10.1080/1355621031000069828>.
- Wang, Y., Liu, S., Su, J., Zhang, Y., Li, J., Sui, Y.-Q., Li, Y.-Y., Wang, H., & Li, H. (2017). Three novel structural phenomena in the cellular ontogeny of *Oenococcus oeni* from northern China. *Scientific Reports*, 7(1), 11265. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09685-1>
- Wedral, Danielle, Robert Shewfelt, and Joseph Frank. (2010) "The Challenge of *Brettanomyces* in Wine." *LWT - Food Science and Technology* 43, no. 10: 1474–79. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.010>.
- Widyastuti, Y., Rohmatussolihat, & Febrisiantosa, A. (2014). The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, 05(04), 435–442. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.54051>
- Zara, Giacomo, Marilena Budroni, Ilaria Mannazzu, Francesco Fancello, and Severino Zara (2020). "Yeast Biofilm in Food Realms: Occurrence and Control." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36, no. 9: 134. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02911-5>.

Annexe I

Moyennes entre les répétitions biologiques pour les cocultures et monocultures : cellules planctoniques de *B. bruxellensis* et *O. oeni* en UFC/mL. Les lettres indiquent les groupes statistiques dans les tableaux. La différence statistique est calculée par Anova à 2 facteurs et test post-hoc LSD.

<i>B. bruxellensis</i> cellules planctoniques (UFC/mL)		
Jours	Monoculture	Coculture
2	3.49 x 10 ⁵ cd	1.91 x 10 ⁴ d
7	7.73 x 10 ⁵ a	3.39 x 10 ⁶ c
14	2.04 x 10 ⁶ b	2.22 x 10 ⁶ b

<i>B. bruxellensis</i> cellules adhérees (UFC/mL)		
JOurs	Monoculture	Coculture
2	3.72 x 10 ³ d	4.39 x 10 ⁴ d
7	1.95 x 10 ³ a	1.53 x 10 ⁵ c
14	8.82 x 10 ⁴ b	3.34 x 10 ⁴ b

<i>O. oeni</i> cellules planctoniques (UFC/mL)		
Jours	Monoculture	Coculture
2	6.27 x 10 ⁴ c	1.04 x 10 ⁶ a
7	5.89 x 10 ⁴ c	6.00 x 10 ⁵ b
14	3.21 x 10 ⁴ c	3.21 x 10 ⁴ b

<i>O. oeni</i> cellules adhérees (UFC/mL)		
Jours	Monoculture	Coculture
2	3.76 x 10 ⁴ b	8.00 x 10 ⁴ b
7	1.40 x 10 ⁵ ab	1.24 x 10 ⁵ ab
14	2.90 x 10 ⁵ a	1.67 x 10 ⁵ a

