



HAL
open science

Développement de procédés innovants de stabilisation microbiologique pour la filière œnologique

Etienne Pilard

► **To cite this version:**

Etienne Pilard. Développement de procédés innovants de stabilisation microbiologique pour la filière œnologique. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0399 . tel-03611861

HAL Id: tel-03611861

<https://theses.hal.science/tel-03611861v1>

Submitted on 17 Mar 2022

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ ŒNOLOGIE

Par Etienne PILARD

**Développement de procédés innovants de stabilisation
microbiologique pour la filière œnologique**

Sous la direction du Pr. Rémy GHIDOSSI

Membres du jury :

Pr. TAILLANDIER, P., Université Paul Sabatier Toulouse
Pr. SAUCIER, C., Université de Montpellier
Dr. LISANTI, M., Università degli Studi di Napoli Federico II
Pr. FERRARI, G., Università degli Studi di Salerno
Pr. GHIDOSSI, R., Université de Bordeaux - ISVV
Dr. ALBERTIN W., Université de Bordeaux
M. COLLANGE, B., Gemstab

Rapportrice
Président du jury
Examinatrice
Co-directrice
Co-directeur
Membre invité
Membre invité

Sommaire

Introduction générale	17
Chapitre I: Étude bibliographique	21
I. La Microbiologie du vin	22
II. Les levures en œnologie	22
II.1. Intérêt des levures	22
II.2. Impact des levures sur l'arôme des vins	23
II.3. Les bactéries en œnologie.....	25
II.3.1. Les bactéries lactiques.....	25
II.3.2. Les bactéries acétiques.....	29
III. Les procédés chimiques de stabilisation microbiologique des vins	31
III.1. Le dioxyde de soufre	31
III.2. Le diméthyle dicarbonate (DMDC).....	33
III.3. L'Acide sorbique	34
III.4. Le lysozyme	35
III.5. Autres intrants œnologiques à action germicide	36
III.5.1. Le chitosan.....	36
III.5.2. Les composés phénoliques	37
III.5.3. Les β -glucanases	38
III.6. Les intrants en cours d'étude pour la stabilisation microbiologique des vins	39
III.6.1. Les bactériocines	39
III.6.2. Les Souches « Killer » de levures	40
III.6.3. Les nanoparticules d'argent	40
III.6.4. L'hydroxytyrosol	42
III.6.5. Les acides gras saturés à chaînes courtes et moyennes.....	43
III.6.6. Les peptides antimicrobiens	44
III.7. Conclusions	45
IV. Les procédés physiques de stabilisation microbiologique des vins.....	46
IV.1. Les procédés physiques conventionnels.....	46
IV.1.1. La microfiltration	46
IV.1.2. Le traitement thermique.....	51
IV.2. Les procédés physiques innovants de stabilisation microbiologique des vins.....	52
IV.2.1. Les Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH).....	52
IV.2.2. Les champs électriques pulsés	53
IV.2.3. Le chauffage ohmique	54
IV.2.4. Les ultrasons.....	55
IV.3. Conclusion	57

V.	Les procédés athermiques innovants : Le rayonnement UV-C	58
V.1.	Principe général des UV-C	58
V.2.	Les mécanismes germicides des UV-C.....	59
V.3.	Les interactions avec la matière.....	66
V.4.	Les réacteurs UV-C continus.....	70
V.5.	Application des UV-C en œnologie.....	73
V.5.1.	La stabilisation microbiologique par UV-C	73
V.5.2.	Impact des UV-C sur la qualité organoleptique des moûts et des vins	79
V.6.	Conclusion	88
VI.	Les procédés athermiques innovants : La lumière pulsée.....	88
VI.1.	Principe général de la lumière pulsée	88
VI.2.	Les mécanismes germicides de la LP	92
VI.3.	Impact de la LP sur la qualité des produits traités	94
CHAPITRE II : Matériels et méthodes		99
I.	Traitements UV-C des différents vins au cours du projet PRISM :.....	100
I.1.	Actinométrie	100
I.2.	Étude de l'impact du traitement UV-C sur 10 aux profils variés	102
I.2.1.	Caractéristiques des vins	102
I.2.2.	Caractéristiques du pilote UV-C.....	102
I.2.3.	Protocole de traitement UV-C.....	103
I.3.	Stabilisation microbiologique d'un vin rouge par traitement UV-C, impact du traitement sur les caractéristiques physico-chimiques et sensorielles.	103
I.3.1.	Traitements UV-C	104
I.3.2.	Suivi microbiologique des vins	105
II.	Analyses physico-chimiques et sensorielles de vins	105
II.1.	Paramètres standards du vin	105
II.2.	Détermination du coefficient d'absorbance à 254nm	105
II.3.	Analyse de la couleur	106
II.3.1.	Mesures des paramètres chromatiques du vin par spectrophotométrie	106
II.3.2.	Colorimétrie – Espace CIELAB.....	106
II.4.	Étude de la composition phénolique par HPLC	107
II.4.1.	Monomères et oligomères de tanins moléculaires	107
II.4.2.	Anthocyanes moléculaires.....	107
II.5.	Étude de la composition volatile par GC-MS.....	108
II.5.1.	Dosage des esters par HS-SPME/GC-MS	108
II.5.2.	Méthode de dosage par GC-FID	109
II.5.3.	Dosage des thiols volatils, de marqueurs d'oxydations, de lactones et de composés C13-norisoprénoïdes par SPE/GCMS.....	109
II.6.	Analyse statistique	110

II.7.	Analyse sensorielle	110
III.	Étude des variabilités intra et interspécifiques de levures vis-à-vis de leur sensibilité au rayonnement UV-C et à la LP sur milieu solide et dans le vin.	111
III.1.	Screening large sur milieu solide.....	111
III.1.1.	Souches de levures sélectionnées	111
III.1.2.	Traitement UV-C sur milieu solide.....	113
III.1.3.	Traitement par LP sur milieu solide.....	114
III.1.4.	Suivi de croissance sur milieu gélosé après traitements UV-C et LP	117
III.2.	Efficacité du traitement UV-C pour la stabilisation d'un vin rouge inoculé avec différentes souches de <i>B. bruxellensis</i>	120
III.2.1.	Adaptation des souches de <i>B. bruxellensis</i> et inoculation dans le vin.....	120
III.2.2.	Traitements UV-C	121
III.2.3.	Dénombrement des levures après traitements	121
III.3.	Efficacité du procédé de LP pour la stabilisation d'un vin rouge inoculé avec différentes espèces et souches de levures	122
III.3.1.	Adaptation des souches de levure et inoculation dans le vin	122
III.3.2.	Traitement par LP	122
III.3.3.	Dénombrement des levures après traitement	124
CHAPITRE III : Étude de la variabilité intra et interspécifique vis-à-vis de la sensibilité au traitement UV-C de levures identifiées dans l'environnement vitivinicole		125
I.	Introduction générale	126
II.	Présentation des résultats	128
II.1.	Introduction	129
II.2.	Materials and methods	131
II.2.1.	Yeast strains.....	131
II.2.2.	Surface UV-C treatment of yeast.....	133
II.2.3.	Growth monitoring from agar-plates	133
II.2.4.	UV-C treatment of red wine	134
II.2.5.	UV-C treatment device	134
II.2.6.	Iodide/Iodate actinometry	135
II.2.7.	2.7. Microbiological analysis.....	136
II.3.	Results	136
II.3.1.	Surface UV-C treatment	136
II.3.2.	UV-C and liquid media	142
II.4.	Discussion	144
II.4.1.	Surface and liquid assays are complementary approaches to assess the impact of UV-C.....	144
II.4.2.	Wine yeast species show strong sensitivity variation to UV-C treatments	145
II.4.3.	<i>B. bruxellensis</i> species show low but significant intraspecific variations to UV-C sensitivity.	146
II.5.	Conclusion	147

III.	Conclusion générale	148
CHAPITRE IV : Étude de la variabilité intra et interspécifique vis-à-vis de la sensibilité au traitement par LP de levures identifiées dans l'environnement vitivinicole		
I.	Introduction générale	154
II.	Présentation des résultats	156
II.1.	Introduction	157
II.2.	Materials and methods	159
II.2.1.	Yeast strains.....	159
II.2.2.	PL treatment of yeast on YPD solid medium	160
II.2.3.	Yeasts growth monitoring after PL treatments on YPD solid medium	161
II.2.4.	PL treatment of yeasts inoculated in red wine.....	161
II.2.5.	Yeasts enumeration before and after red wine PL treatments	163
II.3.	Results	163
II.3.1.	Sensitivity to PL treatment: large screening on Petri dishes	163
II.3.2.	Sensitivity to PL treatment of various yeasts species and strains in red wine	171
II.4.	Discussion	172
II.4.1.	The total fluency and fluency per flash governing the PL efficiency on solid media.....	172
II.4.2.	Cellar resident yeasts expressed higher sensitivity to PL than vineyard yeasts	173
II.4.3.	Intraspecific sensitivity within <i>B. bruxellensis</i> and <i>S. cerevisiae</i>	174
II.5.	Conclusion	175
III.	Conclusion générale	176
CHAPITRE V : Caractérisation de l'impact du procédé UV-C sur les propriétés physico-chimiques de 10 vins de cépages variés.		
I.	Introduction	180
II.	Résultats.....	181
II.1.	Vins rouges	181
II.1.1.	Paramètres standards et couleurs.....	181
II.1.2.	Anthocyanes moléculaires.....	183
II.1.3.	Composition volatile.....	184
II.1.4.	Analyse sensorielle	188
II.2.	Vins blancs et rosé.....	189
II.2.1.	Paramètres standards et couleur	189
II.2.2.	Composition volatile.....	190
II.2.3.	Analyse sensorielle	193
II.3.	Discussion et conclusion	194
CHAPITRE VI : Stabilisation microbiologique par traitement UV-C d'un vin rouge et caractérisation de l'impact du procédé		
I.	Introduction générale	198
II.	Présentation des résultats	199

II.1.	Introduction	200
II.2.	Materials et methods	201
II.2.1.	Red wine	201
II.2.2.	UV-C treatments	201
II.2.3.	Microbiological analyzes	201
II.2.4.	Wines standard parameters	202
II.2.5.	Absorbance coefficient at 254nm	202
II.2.6.	Chromatic parameters	202
II.2.7.	Colorimetry	203
II.2.8.	Proanthocyanin monomers and oligomers quantification	203
II.2.9.	Anthocyanin quantification	204
II.2.10.	Ester quantification by HS-SPME / GC-MS	204
II.2.11.	GC-FID analyzes	205
II.2.12.	Sensory analyzes – Triangular tests	205
II.3.	Results and discussion	206
II.3.1.	Microbial stabilization	206
II.3.2.	Impact on wine’s standard parameters	208
II.3.3.	Impact on wine’s color	208
II.3.4.	Proanthocyanins monomers and oligomers	209
II.3.5.	Molecular anthocyanins	210
II.3.6.	Esters quantification	211
II.3.7.	GC-FID analyzes	212
II.3.8.	Sensory analyzes	212
II.4.	Discussion / Conclusion	213
III.	Conclusion générale	214
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	215
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	221

Abréviations

2-AAP	2-aminoacétophénone	EtOH	Ethanol
3SH	3-sulfanylhexan-1-ol		
4MSP	4-mercapto-4-méthylpentan-2-one	FA	Fermentation alcoolique
6-4 PP	(6-4) pyrimidine-pyrimidone	FEP	Éthylène propylène fluoré
6SH	6-sulfanyl-hexanol	FFT	Furfurylthiol
8-oxo-G	Oxo-7,8-dihydroguanine	FID	Détecteur à ionisation de flamme
A-3SH	Acétate de 3-sulfanylhexan-1-ol	FML	Fermentation malolactique
ADN	Acide désoxyribonucléique	GC	Chromatographie en phase gazeuse
AGS	Acide gras saturé	GR	Grenache
ARN	Acide ribonucléique	H ₂ S	Sulfure d'hydrogène
AT	Acidité totale	HPH	Hautes Pressions Hydrostatiques
ATP	Adénosine triphosphate	HPLC	Chromatographie en phase liquide haute performance
AUC	Aire sous la courbe	HSG-Ag	Complexe argent-glutathion
AV	Acidité volatile	HT	Hydroxytyrosol
BA	Bactérie acétique	IFV	Institut français e la vigne et du vin
BER	Réparation par excision de base	IR	Infra rouge
BL	Bactérie lactique	ISO	Organisation internationale de normalisation
C3OAG	Cyanidine-3-O-acétylglucoside	ISVV	Institut des sciences de la vigne et du vin
C3OG	Cyanidine-3-O-glucoside	LED	Diode électroluminescente
CEP	Champ électrique pulsée	LP	Lumière pulsée
CIFRE	Convention industrielle de formation par la recherche	LPM	Lampe à mercure basse pression
CIVB	Comité interprofessionnel des vins de Bordeaux	LPMHO	Lampe à mercure basse pression à haut rendement
CPD	Dimères cyclobutaniques de pyrimidines	LST	Goût de lumière (Light Struck Taste)
CRB	Centre de ressources biologiques	M	Merlot
CS	Cabernet sauvignon	M3OAG	Malvidine-3-O-acétylglucoside
CS ₂	Disulfure de carbone	M3OCG	Malvidine-3-O-coumarylglucoside
CSC	Complexe colloïdale d'argent (Coloidal silver complex)	M3OG	Malvidine-3-O-glucoside
D3OAG	Delphinidine-3-O-acétylglucoside	MB	Malbec
D3OG	Delphinidine-3-O-glucoside	MeSH	Méthanethiol
De	Nombre de Dean	MET	Microscopie électronique à transmission
DHA	Dihydroxyacétone	MMR	Réparation des mésappariements
DMDC	Diméthyle dicarbonate	MMSB	4-méthoxy-2-méthyle-2-sulfanylbutane
DMDS	Diméthylsulfure	MPM	Lampe à mercure moyenne pression
E2SA	Acétate d'éthyl-2-sulfanyl	MS	Spectrométrie de masse
ERO	Espèce réactive de l'oxygène	NER	Réparation par excision de nucléotide

NHEJ	Jonction d'extrémités non homologues	PVDF	Polyfluorure de vinylidène
OIV	Organisation Internationale de la vigne et du vin	Re	Nombre de Reynolds
OMS	Organisation mondiale de la santé	RF	Riboflavine
PEG-Ag	Complexe argent-polyéthylène-glycol	RTD	Temps de séjour
Peo3OAG	Péonidine-3-O-acétylglucoside	SO ₂	Dioxyde de soufre
Peo3OCG	Péonidine-3-O-coumarylglucoside	SPME	Micro extraction sur phase solide
Peo3OG	Péonidine-3-O-glucoside	SYR	Syrah
Pet3OAG	Pétunidine-3-O-acétylglucoside	TAV	Titre alcoométrique volumique
Pet3OG	Pétunidine-3-O-glucoside	UHP	Ultrasons haute puissance
PN	Pinot noir	YPD	Yeast extract Peptone Dextrose
PVC	Polychlorure de vinyle		

Index des figures

Figure 1 : Représentations des fonctionnements (A) de la filtration frontale et (B) de la filtration tangentielle. (Source : Tel archives ouverte).....	47
Figure 2 : Exemple de filtration sur précouche, fonctionnement d'un filtre rotatif sous vide.	48
Figure 3 : Spectre électromagnétique (www.zontec.net/files/uvSpectrum.gif).....	59
Figure 4 : Mécanismes de formation des CDP et 6-4 PP (Sinha et al., 2002)	60
Figure 5 : Mécanisme de photosensibilisation de types I et II de la riboflavine (Cardoso et al., 2012) ..	61
Figure 6 : Mécanisme de photoréactivation (Sinha et al., 2002)	62
Figure 7 : Mécanisme d'apparition des mutations (Sinha et al., 2002)	63
Figure 8 : Spectre d'émission d'une LPM (A) et d'une MPM (B) (Koutchma, 2009).	65
Figure 9 : Représentation schématique de la transmission du rayonnement UV-C	67
Figure 10 : Effet du coefficient d'absorbance sur la cinétique d'inactivation d'E. coli en solution modèle (Müller et al., 2015).....	69
Figure 11 : Représentation graphique de la variation de profondeur de pénétration (d_p) en fonction du coefficient d'absorbance à 254nm (Junqua, 2017).	69
Figure 12 : Effet de la turbidité sur la cinétique d'inactivation d'E. coli en solution modèle (Müller et al., 2015).....	70
Figure 13 : Représentation des différents types de réacteurs annulaires (A).....	72
Figure 14 : Représentation d'un réacteur hélicoïdale.....	72
Figure 15 : Cinétiques d'inactivation de <i>S. cerevisiae</i> dans différents vins (Junqua, 2017)	74
Figure 16 : Cinétiques d'inactivation de <i>S. cerevisiae</i> dans différents moûts (Diesler et al., 2019)	75
Figure 17 : Cinétiques d'inactivation de <i>S. cerevisiae</i> (FX10), <i>B. bruxellensis</i> (AWRI1608 et CBS2499) et <i>A. aceti</i> (08ba01) dans un vin blanc (Junqua et al., 2020).....	76
Figure 18 : Cinétiques d'inactivation de différentes espèces de levures dans un vin blanc (Junqua et al., 2020).....	77
Figure 19 : Impact du niveau de population initial sur les doses UV-C nécessaires à la stabilisation microbiologique (Diesler et al., 2019)	79
Figure 20 Mécanismes de type I et II de photosensibilisation de la riboflavine (Cardoso et al., 2012) ..	81
Figure 21 : Schéma réactionnel de la photodégradation de la méthionine et de la riboflavine (Fracassetti et al., 2021)	82
Figure 22 : Spectre d'émission de la lumière pulsée.....	89
Figure 23 : Schémas d'un dispositif de lumière pulsée.	90
Figure 24 Observation par microscopie à transmission électronique de cellules de <i>S. cerevisiae</i> (Takeshita et al., 2003)	94
Figure 25 : Photographie de deux modules de traitements UV-C branchés en série	103
Figure 26 : Photographie du pilote UV-C.....	104
Figure 27 Espace colorimétrique CIELAB.....	106
Figure 28 : Protocole de sortie de collection et d'inoculation sur boîte de Petri préalablement aux traitements UV-C.....	114
Figure 29 Schémas d'inoculation des souches sur boîte de Petri préalablement aux traitements par LP	115
Figure 30 : Dispositif de traitement par LP (LP.Box , Sanodev, France)	116
Figure 31 : A, D, G et J : Photographies des boîtes de Petri et croissances des microorganismes pour différents traitements UV-C en fonction du temps ;.....	118
Figure 32 : (A) Pourcentages de variations expliqués par les différents facteurs ; (B) Courbes d'isoréponse	119
Figure 33 : Dispositif de traitement continu du vin par LP.....	123

Figure 34 : Schéma du protocole d'étude de la diversité spécifique vis-à-vis de la sensibilité au rayonnement UV-C.....	127
Figure 35 : Schematic representation of coiled UV-C reactor.....	135
Figure 36 : Impact of UV-C treatment on growth of four yeast strains.	137
Figure 37 : Impact of UV-C treatment (A), drop density (B) and species (C) on yeast growth.	140
Figure 38 : Impact of UV-C treatment (A), drop density (B) and species (C) on yeast growth regarding the genetic groups of 104 strains of <i>B. bruxellensis</i>	142
Figure 39 : Survival curves of <i>B. bruxellensis</i> strains for UV-C treatment in red wine.....	143
Figure 40 : Schéma du protocole d'étude de la diversité spécifique vis-à-vis de la sensibilité à la lumière pulsée.....	155
Figure 41 : Experimental setup for PL treatment of wine.....	162
Figure 42 : Growth kinetics of three yeast strains depending on the total fluency applied on the pulsed light treatment (0, 84, 210, 420, 630, 840 and 1050 mJ.cm^{-2}).	164
Figure 43 : Growth kinetics of three yeast strains depending on four different fluency per flash applied on the pulsed light treatment (0, 22, 42 and 87 mJ.cm^{-2}).	165
Figure 44 : Growth kinetics of three yeast strains depending on the frequency applied on the pulsed light treatment (1, 2 and 5 Hz)	166
Figure 45 : Factors impacting pulsed light treatment efficiency.....	168
Figure 46 : Clustering of 198 yeast strains depending on their sensitivity to pulsed light treatment.....	169
Figure 47 : Influence of pulsed light treatments on the growth of <i>S. cerevisiae</i> and <i>B. bruxellensis</i> subgroups.....	170
Figure 48 : Cultivability of 9 strains under 4 increased PL treatment. (A) Cultivability is expressed in CFU.mL^{-1}	172
Figure 49 : Total yeasts enumeration in control and UV-C treated wines immediately after treatments (day 0), after 30 days (day 30) and after 90 days (day90).....	207
Figure 50 : Total bacteria enumeration in control and UV-C treated wines immediately after treatments (day 1), after 30 days (day 30) and after 90 days (day90).....	208

Equations

$A = c \times \varepsilon \times d$ Équation 1.....	67
$\alpha = A/d$ Équation 2	67
$\lambda = 1/\alpha$ Équation 3.....	67
$T = I/I_0$ Équation 4.....	67
$Re = \rho V D\mu$ Équation 5.....	72
$De = Redidc$ Équation 6.....	73
$8KI + KIO_3 + 3H_2O + hv \rightarrow 3I_3^- + 6OH^- + 9K^+$ Équation 7	101
$Dv = A_{352nm} \times P_{253,7nmL} \times \varphi \times \varepsilon_{352nm}$ Équation 8	101
$\varphi = 0.73 \times 1 + 0.23 \times Ci - 0.577 \times 1 + 0.02Ti - 20.7^\circ C$ Équation 9	101
$\Delta E = \Delta L * ^2 + \Delta a * ^2 + (\Delta b *)^2$ Équation 10.....	107

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales altérations d'origine levurienne et espèces associées (Du Toit et al., 2000)...	24
Tableau 2 : Principales altérations d'origine bactérienne et espèces associées (Du Toit and Pretorius, 2000).....	28
Tableau 3 : Coefficients d'absorbance à 254nm, transmittances et profondeurs de pénétration de liquides alimentaires variés (Koutchma T., 2009).	68
Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques principales des vins avant traitement UV-C.....	102
Tableau 5 : Espèces et souches de levures sélectionnées pour l'étude de la variabilité intra et interspécifique vis-à-vis de la sensibilité au rayonnement UV-C.	112
Tableau 6 : Espèces et souches de levures sélectionnées pour l'étude de la variabilité intra et interspécifique vis-à-vis de la sensibilité à la LP.....	112
Tableau 7 : Modalité de traitement par LP des différentes souches de levures inoculées sur boîte de Petri	115
Tableau 8 : Strains used in this work.....	132
Tableau 9 : K-means classes from Normalized AUC with a number of strains per species or genetic groups for the B. bruxellensis species.	138
Tableau 10 : Impact of various factors on yeast growth.....	140
Tableau 11 : List of the strains used in this work.	159
Tableau 12 : List of the 15 modalities of PL used for the plate screening.	160
Tableau 13 : Paramètres standards 6 mois après traitement : Merlot, Cabernet sauvignon, Syrah, Pinot noir, Malbec et Grenache avec et sans traitement aux UV-C.....	181
Tableau 14 Absorbances à 420, 520 et 620 nm et paramètres colorimétriques (CIELab) des vins de Cabernet sauvignon, Merlot, Syrah, Pinot noir, Grenache et Malbec après 6 mois de conservation.	182
Tableau 15 : Teneurs (mg.L ⁻¹ équivalent malvidine-3-O-glucoside) en anthocyanes moléculaires après 6 de conservation des vins de Merlot, Cabernet sauvignon, Syrah, Pinot noir, Malbec et Grenache avec et sans traitement aux UV-C.	183
Tableau 16 : Concentrations des esters (en µg.L ⁻¹) significativement impactés (α=5%) suites au traitement UV-C dans les vins de Merlot, Cabernet sauvignon, Syrah, Pinot noir, Malbec et Grenache 6 mois après traitement.	185
Tableau 17 : Descripteurs aromatiques et seuils olfactifs des composés volatils dosés dans les vins rouges. (VB : vin blanc ; VR : vin rouge ; SM ; solution modèle).	186
Tableau 18 : Concentrations en différents thiols volatils, composés C13-norisoprénoides, lactones et marqueurs d'oxydation dans les vins de Cabernet sauvignon, Merlot, Syrah, Malbec et Grenache (6mois après traitement UV-C).	187
Tableau 19 Résultats des tests triangulaires réalisés pour les vins de Merlot, Cabernet sauvignon, Syrah, Pinot noir, Grenache et Malbec (n : Nombre de dégustateur).	188
Tableau 20 : Paramètres standards 6 mois après traitement : Sauvignon blanc, Gewurztraminer, Chardonnay et du rosé de Provence avec et sans traitement aux UV-C.	189
Tableau 21 : Absorbances à 420, 520 et 620 nm et paramètres colorimétriques (CIELab) des vins de Sauvignon blanc, Gewurztraminer, Chardonnay et du rosé de Provence après 6 mois de conservation.	189
Tableau 22 : Concentrations des esters significativement impactés (α=5%) suites au traitement UV-C dans les vins de Sauvignon blanc, Gewurztraminer, Chardonnay et du rosé de Provence 6 mois après traitement.	190
Tableau 23 : Descripteurs aromatiques et seuils de perception olfactifs des composés dosés pour les vins blancs et le rosé.	192

Tableau 24 : Concentrations en différents thiols volatils, composés C13-norisoprénoïdes et marqueurs d'oxydation dans les vins de Chardonnay, Sauvignon blanc, Gewürztraminer et le rosé de Provence (6mois après traitement UV-C).	192
Tableau 25 Résultats des tests triangulaires réalisés pour les vins de Sauvignon blanc, Chardonnay, Gewurztraminer et le rosé de Provence (n : Nombre de dégustateur).	193
Tableau 26 : MALDI-TOFF identification of <i>B. bruxellensis</i> among NS yeasts one month after UV-C treatments.....	206
Tableau 27 : MALDI-TOFF identification of <i>B. bruxellensis</i> among NS yeasts three months after UV-C treatments.....	207
Tableau 28 : Standard parameters in control and UV-C treated wines.	208
Tableau 29 : CIELAB parameters and absorbance at 420, 520 and 620 nm of control and UV-C treated wines.	209
Tableau 30 : Proanthocyanins monomers and oligomers concentrations in control and UV-C treated wines (mg.L ⁻¹ catechin).....	210
Tableau 31 : Molecular anthocyanins concentrations in control and UV-C treated wines (mg.L ⁻¹ malvidin-3-O-glucoside).	211
Tableau 32 : Ethyl cinnamate concentrations in control and UV wines.	211
Tableau 33 : Results for GC-FID analyzes in control and UV-C treated wines.....	212
Tableau 34 : Triangular tests results; comparisons of control and UV-C treated wines with 5600 J.L ⁻¹ and 6400 J.L ⁻¹	212

Introduction générale

Le marché du vin, représente approximativement 280 millions d'hectolitres (MiohL) chaque année dont 160 MiohL produits en Europe, avec 46,6 MiohL en France, 49,1 MiohL en Italie et 40,7 MiohL en Espagne (OIV- Note de conjoncture vitivinicole mondiale, 2020). À eux seuls, ces trois pays représentent 50 % de la production mondiale de vins. Riche d'une histoire millénaire, le vin est indissociable de la culture, du patrimoine, des terroirs et de l'économie française. Le secteur des vins et spiritueux représente pour la France 11,5 milliards d'excédents commerciaux (dont 8,7 milliards pour le vin), ce qui le place en deuxième position derrière le secteur aérospatial et devant celui de la cosmétique. Derrière ces chiffres se cache une autre réalité, la consommation de vin en Europe ralentit. En 20 ans cette baisse représente une diminution de 38 %. Alors qu'en 1975 elle était de 100 litres par habitant et par an, elle est tombée à 42 litres par habitant et par an. La France reste le premier pays consommateur de vin en Europe devant l'Italie, le Portugal et l'Espagne, « absorbant » 14 % du vin produit dans le monde. Cette diminution est liée à une évolution de la manière dont le vin est consommé. De nos jours, la consommation occasionnelle (1 à 2 une fois par semaine ou plus rarement) prime sur la consommation régulière (quotidienne ou quasi quotidienne) (Alonso Ugaglia et al., 2019). De plus, les acheteurs deviennent exigeants vis-à-vis du secteur agroalimentaire et souhaitent des produits à la fois respectueux de l'environnement et bons pour la santé. Le vin ne fait pas exception à la règle et l'augmentation de la production des vins biologiques et biodynamiques (+18 % an depuis 10 ans) le démontre. La tendance est donc à une production de vins dont les itinéraires incluent peu, pas ou en tout cas moins d'intrants chimiques et il devient urgent pour le secteur vitivinicole de répondre à ces nouvelles demandes. Cette adaptation de la filière est un argument commercial fort qui permettra de maintenir la compétitivité des producteurs. La diminution de l'utilisation des intrants en œnologie implique notamment une réduction des teneurs en sulfites (SO₂) dans les vins. En effet, le SO₂ est l'intrant chimique majoritaire utilisé au cours du procédé de vinification depuis la fin du XVII^{ème} siècle, en raison de ses propriétés antiseptiques, antioxydantes, antioxydasiques, ainsi que son faible coût. Cette molécule permet depuis la réception de la vendange jusqu'à la mise en bouteille l'inhibition des microorganismes d'altération ainsi que la protection des vins vis-à-vis des phénomènes oxydatifs (chimiques et enzymatiques). Au-delà de 10 mg.L⁻¹ de SO₂ total dans le vin fini, l'étiquette sur la bouteille

doit présenter la mention « Contient des sulfites ». Cette obligation est l'une des nombreuses réglementations qui régulent l'utilisation des sulfites en raison de ses propriétés allergéniques avérées. L'utilisation des sulfites est réglementée en Amérique Nord, en Europe et dans la majorité des pays producteurs de vin. Pour ces raisons, les concentrations maximales de SO_2 total utilisées dans les vins sont progressivement réduites au fil du temps par l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) et les réglementations européennes. En France, en 1907, la dose maximale autorisée dans les vins était de 350 mg.L^{-1} , en 1926 cette dose maximale passe à 450 mg.L^{-1} . En 1999, le règlement européen fixe les teneurs maximales à 160 mg.L^{-1} pour les vins rouges secs et 210 mg.L^{-1} pour les vins blancs secs (Dubourdieu et al., 2006). Enfin, depuis 2009 cette dose varie selon les types de vins de 150 mg.L^{-1} pour les vins rouges à 400 mg.L^{-1} pour les vins blancs contenant plus de 5 g.L^{-1} de sucres résiduels (EU Réglementation No. 606/2009). Cependant, dans le contexte actuel de réchauffement climatique qui engendre une nette diminution de l'acidité des vins, l'utilisation de SO_2 aux doses réglementaires pourrait ne plus suffire pour assurer la stabilité microbiologique. En effet, les modifications du climat entraînent une augmentation globale du pH des vins et donc une diminution de l'efficacité germicide du SO_2 (Van Leeuwen et al., 2016). D'autre part, l'utilisation généralisée du SO_2 dans l'environnement vitivinicole est à l'origine d'un phénomène de sélection naturelle vis-à-vis de la tolérance à la molécule et plusieurs études récentes font état de l'émergence de souches résistantes aux sulfites, notamment parmi des espèces de microorganismes d'altération (Avramova et al., 2016). Ces phénomènes sont et seront de plus en plus responsables de la résurgence de déviations organoleptiques d'origine microbiologique dans les vins ce qui pourrait impacter économiquement la filière.

L'utilisation du dioxyde de soufre n'est pas la seule option pour assurer la stabilisation microbiologique des vins et des moûts, l'utilisation d'autres intrants (DMDC, acide sorbique, lysozyme ...) et de procédés physiques (flash-pasteurisation, techniques de filtration...) permet de remplacer ou de compléter les ajouts de SO_2 . Cependant, à l'heure actuelle, aucun d'entre eux ne possède l'action complète conférée par l'action du SO_2 notamment vis-à-vis de son activité antioxydante et antioxydasique. Les procédés physiques utilisés pour la stabilisation microbiologique sont essentiellement des traitements thermiques (flash pasteurisation) ou des techniques séparatives (filtration), ces procédés sont largement répandus afin d'inhiber ou d'éliminer les microorganismes présents dans le vin. Cependant, les traitements

thermiques traditionnels exposent les aliments à des températures de l'ordre de 60 à 100 °C, durant des temps variant de quelques secondes à quelques minutes, ce qui peut nuire à la qualité du produit. De la même façon, la filtration stérilisante des vins est souvent complexe à mettre en place et nécessite souvent plusieurs étapes de préparation afin d'éviter des phénomènes de colmatage pouvant impacter significativement la qualité du produit fini.

Dans ce contexte, la recherche de moyens alternatifs pour assurer la stabilité microbiologique des vins est indispensable, et la recherche de procédés innovants présente un réel intérêt pour la filière et est l'objet de perpétuelles avancées. Ces technologies doivent également permettre de réduire les coûts énergétiques liés à l'utilisation d'un procédé physique

Des alternatives permettant d'assurer la stabilisation microbiologique issues du traitement de l'eau et d'aliments existent. Parmi elles, les techniques athermiques présentent une alternative séduisante. À ce titre, le rayonnement UV continu (UV-C) et la lumière pulsée (LP) sont deux technologies qui peuvent présenter un fort potentiel d'utilisation en œnologie. Ces deux procédés sont basés sur l'émission de longueurs d'onde germicides notamment dans le domaine UV du spectre électromagnétique. Une différence importante réside dans la composition du spectre d'émission et dans la manière dont le rayonnement est distribué. Le rayonnement UV-C correspond à l'application d'un rayonnement continu d'intensité faible à moyenne et essentiellement monochromatique (254 nm). La lumière pulsée quant à elle délivre un rayonnement de très haute intensité sous la forme de flashes de quelques dizaines à centaines de microsecondes dont le spectre d'émission comprend des longueurs d'onde dans le domaine UV, dans le visible et dans le domaine infrarouge (200-1100 nm). Les propriétés germicides de ces procédés reposent essentiellement sur l'inhibition des métabolismes cellulaires induite par l'interaction du rayonnement UV avec l'ADN (Acide désoxyribonucléique), l'ARN (Acide ribonucléique) et les protéines des microorganismes. Des résultats très prometteurs ont été obtenus à la suite du programme « REASON » ainsi que dans des études de plus en plus nombreuses concernant l'utilisation du rayonnement UV-C pour la stabilisation microbiologique des moûts et vins. Son efficacité a été démontrée sur quelques microorganismes identifiés dans l'environnement vitivinicole et son impact sur les propriétés organoleptiques des moûts et vins traités semble à l'heure actuelle faible. La LP est pour l'instant très peu étudiée pour son potentiel en œnologie malgré le fait qu'elle soit souvent considérée comme une « version améliorée » du traitement par UV-C. Cependant,

ces 20 dernières années les exemples de son utilisation dans le domaine de l'agroalimentaire se multiplient notamment pour la désinfection de surface de produits et d'emballages alimentaires ou pharmaceutiques. Les UV-C et la lumière pulsée ont donc un potentiel d'application très vaste dans le domaine de l'agroalimentaire et des biotechnologies. L'adaptation à la filière vitivinicole pourrait être un élément de réponse à la problématique de réduction des intrants au cours de la vinification.

Cependant, pour permettre l'émergence de ces procédés au sein de la filière vitivinicole, il est nécessaire (i) d'apporter des exemples concrets d'application de ces procédés au cours de la vinification, (ii) de déterminer les conditions optimales de traitement pour différents types de vin et de microorganismes et enfin (iii) d'évaluer le risque potentiel de modification des propriétés organoleptiques et toxicologiques des vins traités.

Le projet PRISM est une thèse CIFRE cofinancée par le Comité Interprofessionnel des Vins de Bordeaux (CIVB) et la société Gemstab qui vise à répondre à ces questions. Ce projet a également été réalisé en collaboration avec l'université de Salerne (UNISA) et l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV).

Le document suivant est une compilation sous forme d'articles scientifiques des travaux réalisés au cours de ce projet. Une première partie sous la forme d'une étude bibliographique a été réalisée afin de présenter les risques d'origine microbologique au cours de la vinification ainsi que les procédés et intrants permettant la stabilisation microbologique des moûts et des vins. La seconde partie de ce présente l'ensemble des protocoles de traitement par UV-C et LP réalisés au cours de ce projet ainsi que les diverses méthodes d'analyses physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles des vins. La troisième partie de ce document présente les résultats obtenus concernant les possibilités de stabilisation microbologique par UV-C / LP et sur la caractérisation de l'impact du procédé UV-C sur différents vins.

Chapitre I: Étude bibliographique

I. La Microbiologie du vin

Le jus de raisin (moût) ainsi que le vin en tant que boissons fermentescibles ou fermentées sont deux niches écologiques favorables au développement de différents genres, espèces et souches de microorganismes (levures, bactéries, moisissures et virus. Tout au long de la vinification, ces microorganismes interagissent de façon complexe entre eux, avec le moût ou le vin (Fugelsang et al., 2007). Le contrôle de ces populations de microorganismes permet soit d'assurer leur implantation et leur survie (lorsque leur présence et leur activité sont désirées), soit de limiter leur développement (notamment en ce qui concerne les différents microorganismes d'altération). Une bonne gestion du microbiome est indispensable tout au long de la vinification, elle permet une bonne réalisation des activités fermentaires et la diminution des risques d'altérations d'origines microbiologiques. Le contrôle de l'activité microbiologique est donc un paramètre clé afin de maîtriser la qualité finale des vins et leur conservation. Dans cette partie nous ferons un état des lieux des différentes espèces de levures et bactéries identifiées en œnologie et nous discuterons des bénéfiques et des risques liés à leurs activités métaboliques respectives.

II. Les levures en œnologie

II.1. Intérêt des levures

Les levures sont prédominantes au cours du processus de vinification. Parmi les 100 genres de levure comprenant plus de 700 espèces, seulement une dizaine sont associées à la vinification : *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea* et *Zygosaccharomyces* (Fleet et al., 2007). Bien que le moût de raisin soit relativement riche en éléments nutritifs, il n'est propice qu'à la croissance d'un nombre limité de microorganismes. Le pH bas (compris généralement entre 3 et 4) et la teneur importante en sucre du moût (200 à 400 mg.L⁻¹) exercent une pression de sélection importante sur les microorganismes, de sorte que seules quelques espèces de levures et de bactéries peuvent s'y adapter. La sélectivité du moût en fermentation est renforcée par l'apparition progressive de conditions semi-anaérobiques/anaérobiques, l'appauvrissement en nutriments et l'augmentation de la concentration en éthanol dans le milieu (Fleet et al., 1998). D'une manière générale, les levures sont indispensables à la vinification, leur présence

assure la conversion des sucres en alcool permettant ainsi l'évolution du moût en vin. Ce phénomène longtemps inexpliqué a été décrit pour la première fois par Louis Pasteur en 1855, lors de ses recherches sur le jus de betterave (Catsaras et al., 1955). *Saccharomyces cerevisiae* est la levure majoritairement identifiée en vinification, souvent inoculée pour la réalisation des fermentations alcooliques (FA), *S. cerevisiae* est aussi naturellement présente sur la baie de raisin. Sa présence et sa survie au cours de la FA sont favorisées par sa tolérance (i) aux températures élevées, (ii) à des concentrations importantes en éthanol et en dioxyde de soufre, mais aussi par (iii) sa capacité à se développer au pH bas du vin (compris généralement entre 3 et 4) (Börlin et al., 2020). Ainsi, de par ces caractéristiques, *S. cerevisiae* est présente dans l'ensemble des fermentations alcooliques (même lorsqu'elle n'est pas inoculée) et elle l'une des seules levures capables de réaliser des fermentations complètes en consommant l'intégralité des sucres fermentescibles présents dans le moût de raisin. Ces propriétés lui permettent ainsi d'occuper le milieu fermentaire jusqu'à l'aboutissement de la fermentation réduisant ainsi les risques d'altérations liés à un ralentissement de l'activité fermentaire et/ou au développement de microorganismes d'altération opportunistes (Pretorius et al., 1999). Dans le contexte de fermentations spontanées, des espèces de levures indigènes (*Saccharomyces non-cerevisiae* et Non-*Saccharomyces*) peuvent aussi se succéder en fonction de l'évolution des caractéristiques du moût (teneur en sucre/éthanol, appauvrissement du milieu, aérobie/anaérobie, températures...). Les levures du genre *Kloeckera*, *Hanseniaspora* et *Candida* prédominent dans les premières étapes de la fermentation. Avec l'augmentation de la teneur en éthanol (3-4 %), les conditions deviennent plus propices au développement de levure des genres *Metshnikowia* et *Pichia*. En fin de fermentation, ce sont des souches de *S. cerevisiae* qui occupent majoritairement le milieu avec possiblement d'autres espèces tolérantes à l'alcool telles que des levures de genres *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* ou encore *Zygosaccharomyces* (Fleet et al., 1993).

II.2. Impact des levures sur l'arôme des vins

La FA conduit à une synthèse plus ou moins importante d'arômes dit fermentaires (ou aromes secondaires) principalement des esters et des alcools supérieurs, mais aussi à la libération enzymatique d'arômes variétaux (ou aromes primaires) jusqu'alors inodores et non volatils, car conjugués sous forme glycosylées ou cystéinylées tels que les thiols et les composés C13-norisoprénoides (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Ainsi, cette phase de la vinification a un impact

bénéfique sur le profil aromatique en donnant au vin « le goût du vin » et en révélant certains arômes variétaux (thiols, terpènes et composés norisoprénoïdes). Cependant, des métabolismes associés à certaines espèces ou à des conditions de fermentations particulières peuvent également avoir un impact négatif sur les vins.

Les défauts d'origine levurienne sont principalement liés à (i) la synthèse de phénols volatils par *B. bruxellensis*, (ii) la production d'acide acétique et des esters qui en dérivent (défauts dits de « piqure »), (iii) la synthèse d'éthanal, (iv) à des métabolismes fermentaires non voulus après mise en bouteilles et enfin (v) à une dégradation générale de l'aspect visuel des vins liée à des phénomènes de sédimentation, d'augmentation de la turbidité ou d'apparition de voile. Les principales altérations d'origine levurienne sont listées ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1 : Principales altérations d'origine levurienne et espèces associées (Du Toit et al., 2000).

Levures	Altération	Référence
<i>S. cerevisiae</i>	Refermentation (vin avec sucres résiduels)	(1); (3)
<i>B. bruxellensis</i>	Production de phénols volatils Production de tétrahydropyridines Production d'acide acétique et des esters correspondants	(1); (2); (6); (9)
<i>Candida spp.</i> <i>C. vini</i> <i>C. stellata</i> <i>C. pulcherrima</i> <i>C. krusei</i>	Formation de biofilm en surface (voile) Production d'acétaldéhyde Production d'acide acétique et des esters correspondants	(3); (4); (5); (9)
<i>Pichia spp.</i> <i>P. anomala</i> <i>P. farinosa</i> <i>P. membranaefaciens</i> <i>P. vini</i>	Formation de biofilm en surface (voile) Production d'acétaldéhyde Production d'acide acétique et des esters correspondants	(1); (3); (9); (10)
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Acidité volatile Production de toxines	(5); (3); (10)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Refermentation (vin avec sucres résiduels) Désacidification	(1); (5); (7)
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	Production d'acétaldéhyde Formation d'amas blancs et floconneux	(1); (3)
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Refermentation (vin avec sucres résiduels) Production d'acide acétique et des esters correspondants	(1); (5); (8); (9)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Formation de biofilm en surface (voile) Production d'acétate d'éthyle et d'acétaldéhyde	(9)

[(1) Boulton et al., 1996 ; (2) Chatonnet et al., 1995 ; (3) Fleet et al., 1992 ; (4) Fleet et al., 1998 ; (5) Fulsegang et al., 1997 ; (6) Heresztyn et al., 1986 ; (7) Kunkee et al., 1993 ; (8) Soles et al., 1982 ; (9) Sponholz et al., 1993 ; (10) Zoecklein et al., 1995]

Parmi les altérations microbiologiques d'origine levurienne, la production de phénols volatils (4-vinylphénol, 4-éthylphénol, 4-vinylgâïacol et de 4-éthylgâïacol) par la levure *Brettanomyces bruxellensis* est l'une des plus redoutées par les vinificateurs. La levure *Brettanomyces* est retrouvée dans de nombreux produits fermentés. Dans l'environnement vitivinicole, elle a pu être isolée sur des baies de raisin, dans le vin ainsi que sur le matériel de vinification (Curtin et al., 2015). Dans les premières phases de la vinification, elle est généralement présente à des niveaux de population plus faibles que les autres levures responsables de la FA. Le fait que *B. bruxellensis* tolère des concentrations élevées en éthanol (jusqu'à 14.5-15 %), un pH et un niveau d'oxygène faibles, une faible teneur en sucre (inférieure à 300 mg.L⁻¹) ainsi qu'en azote fermentescible lui confère un bon niveau d'adaptation au vin après FA (Curtin et al. 2015). Successivement et au cours de la fermentation malolactique (FML), les populations de *B. bruxellensis* peuvent augmenter (Renouf et al. 2006) et jusqu'à en faire la levure dominante, affectant ainsi sérieusement les caractéristiques sensorielles du vin. La production de phénols volatils est réalisée par transformation des acides hydroxycinnamiques (principalement l'acide férulique et l'acide para-coumarique) naturellement présents dans les moûts de raisins rouges et les vins, entre 1.1 et 6.5 mg.L⁻¹. A des concentrations supérieures à leur seuil de perception (400-600 µg.l⁻¹ dans le vin), ils ont un impact négatif sur le profil sensoriel du vin, conférant des arômes indésirables, tels que des odeurs animales, de sueur de cheval ou encore médicamenteuses (Chatonnet et al. 1992). Même lorsque ces descripteurs négatifs ne sont pas perçus, ces phénols volatils entraînent une diminution de la perception du caractère fruité et des arômes variétaux du vin. Les phénols volatils ne sont pas les seuls composés indésirables produits par *B. bruxellensis*. L'augmentation de l'acidité volatile, l'apparition d'odeurs savonneuses liées à la synthèse d'acides décanoïques ainsi que la synthèse de tétrahydropyridines responsables du goût de souris sont aussi des marqueurs du développement de *B. bruxellensis* dans les vins (Snowdon et al., 2006).

II.3. Les bactéries en œnologie

II.3.1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) jouent un rôle primordial lors de la seconde fermentation du vin, appelée la fermentation malolactique (FML). Ce sont des bactéries à Gram positif, anaérobies facultatives. Seulement quatre genres de BL sont associés au moût et au vin : *Lactobacillus*,

Leuconostoc, *Oenococcus* et *Pediococcus* (Fleet, 1993 ; Lonvaud-Funel, 1999). *Oenococcus oeni* est l'espèce bactérienne la plus souvent associée à la FML. Celle-ci peut avoir lieu simultanément avec la FA ou plus tardivement et peut démarrer spontanément ou bien être déclenchée par inoculation. En l'absence de sucres résiduels, les BL sont capables de dégrader l'acide malique en acide lactique (avec production de CO₂) réalisant ainsi la FML. Cette seconde fermentation a pour conséquence une diminution de l'acidité totale et est souvent réalisée dans l'optique d'assouplir un vin trop acide. La FML permet aussi d'augmenter la stabilité microbiologique du vin en consommant les éléments nutritifs présent (Inês et al., 2018). La FML est principalement réalisée pour la vinification des vins rouges, mais peut faire partie de l'itinéraire de vinification de certains vins blancs. Indispensable à la réalisation de la FML, la présence de BL à tout autre moment de la vinification peut être néfaste à la qualité du vin de nombreuses façons (Tableau 2).

En effet, lors d'une FA incomplète ou d'un arrêt de fermentation, les bactéries lactiques présentes dans le milieu peuvent dégrader les sucres fermentescibles et non fermentescibles ce qui peut conduire à l'apparition des piqures lactiques et mannitiques. Dans le cas d'une piqure lactique, on observe une augmentation de l'acidité volatile liée à la synthèse d'acide acétique ainsi qu'à l'augmentation de la concentration en acide D-lactique et de diacétyle. Lors de la dégustation des vins piqués, on remarque ainsi l'apparition de notes aromatiques « lactiques » associées au descripteur yaourt ou lait fermenté (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Lorsque ce phénomène est accompagné de la synthèse de mannitol (réduction du fructose et du fructose-6-phosphate) on parle alors de piqure mannitique. Le mannitol lui-même n'induit pas de modification de la qualité du vin, le problème étant la production concomitante d'acide acétique, d'acide D-lactique et de diacétyle. (Du toit et Pretorius 2000)

La réalisation de la FML, peut elle-même être considérée comme un défaut lorsqu'elle n'est pas désirée ou non maîtrisée. Plus particulièrement pour les vins blancs la diminution de l'acidité peut être associée à une diminution de la fraîcheur du vin. La FML, peut également avoir lieu après la mise en bouteille, notamment dans le cas de vin au pH élevé (> 3.5), donnant lieu à des vins effervescents, présentant un voile, un trouble ou une précipitation et une diminution de l'acidité totale (Du toit et Pretorius 2000).

En parallèle de la transformation de l'acide malique en acide lactique, certaines BL ont la capacité de métaboliser d'autres acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide sorbique

et l'acide tartrique. Ces métabolismes ont un impact direct sur la perception de l'acidité du vin. De plus, la dégradation de ces acides organiques par des BL donne lieu à la production de composés pouvant impacter négativement la qualité du vin. Les produits issus du métabolisme de l'acide citrique, plus particulièrement le diacétyle et le 2,3-butanediol, peuvent conférer au vin des notes lactées/beurrées ayant un impact gustatif négatif à fortes concentrations (Nielsen et al., 1996). En ce qui concerne l'acide sorbique, sa dégradation a pour conséquence la synthèse de sorbitol pouvant servir à la production de 2-éthoxyhexa-3,5-diène, composé à l'odeur proche de celle d'une feuille géranium (Fugelsang, 1997). Enfin, plus rarement, la dégradation de l'acide tartrique (maladie de la tourne) par certaines BL (*L. plantarum* et *L. brevis*), conduit à une augmentation de l'acidité volatile ainsi qu'à la production de CO₂ et d'acide lactique ou succinique en fonction de l'espèce responsable (Du Toit et Pretorius, 2000). L'acide tartrique (avec l'acide malique) étant le principal responsable de l'acidité du vin, les vins touchés par la maladie de la tourne présentent donc une acidité fortement diminuée.

D'autres défauts aromatiques sont liés au développement non désiré de BL dans le vin, c'est par exemple le cas du goût de souris qui est une déviation organoleptique évoquant une odeur d'urine de souris (souvent associé au pop-corn). Les mécanismes d'apparition de ce défaut ne sont pas encore complètement expliqués. Selon Snowdon et al., (2020), le genre de BL principalement responsable de ce défaut est *Lactobacillus* bien que *B. bruxellensis* puisse aussi y être associé. Le goût de souris est lié à la synthèse du 2-acetyl-1,4,5,6-tetra hydroypyridine et son isomère le 2-acetyl-3,4,5,6-tetra hydroypyridine.

La maladie de l'amertume est un défaut lié au métabolisme du glycérol. La fermentation anaérobie du glycérol par certaines BL du genre *Lactobacillus* aboutit à la synthèse de 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA), un composé précurseur de l'acroléine. L'acroléine est un composé toxique qui par réaction avec un composé phénolique induit une augmentation importante de l'amertume (Bauer et al., 2010).

La maladie des « vins filants » ou « maladie de la graisse » est un défaut lié à la synthèse de polysaccharides extracellulaires par les bactéries lactiques des genres *Pediococcus* et *Leuconostoc*. La production de polysaccharides se traduit par une augmentation de la viscosité du vin qui peut être mesurée ou appréciée visuellement par le caractère filant du milieu (Du Toit et Pretorius, 2000 ; Ribéreau-Gayon, 2006).

Tableau 2 : Principales altérations d'origine bactérienne et espèces associées (Du Toit and Pretorius, 2000)

Bactéries	Altérations	Références
Bactéries lactiques		
<i>Lactobacillus brevis</i>	Production de précurseurs de l'éthyle carbamate Dégradation de l'acide tartrique Production d'acide acétique et lactique Production de mannitol via la réduction du fructose Goût de souris (Tétrahydropyridines)	(10); (16)
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	Goût de souris (Tétrahydropyridines) Production de précurseurs de l'acroléine	(16);
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Goût de souris (Tétrahydropyridines) Production de précurseurs de l'acroléine	(16);
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	Production d'acide acétique Impliquée dans des arrêts de fermentation	(5); (6)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Dégradation de l'acide tartrique Production importante de diacétyl	(14);
<i>Lactobacillus trichodes</i>	Trouble et sédimentation	(1);
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Production de précurseurs de l'acroléine Production d'exopolysaccharides (vin filant)	(7); (16)
<i>Oenococcus oeni</i>	Production de précurseurs de l'éthyle carbamate Production importante de diacétyl Production d'amines biogènes Impliquée dans des arrêts de fermentation	(5); (8); (9); (12); (15)
<i>Pediococcus damnosus</i>	Production d'exopolysaccharides (vin filant) Production d'amines biogènes	(4); (11)
<i>Pediococcus parvulus</i>	Production de précurseurs de l'acroléine	(3);
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Production d'exopolysaccharides (vin filant)	(13);
Bactéries acétiques		
<i>Acetobacter aceti</i>	Production importante d'acide acétique	(2); (7); (16)
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Production d'acétate d'éthyl	
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde Production d'acétoïne Production de dihydroxyacétone Production d'exopolysaccharides (vin filant)	

[(1) Amerine et al., 1968 ; (2) Boulton et al., 1996 ; (3) Davis et al., 1988 ; (4) Delfini et al., 1989 ; (5) Edwards et al., 1998 ; (6) Edwards et al., 1999 ; (7) Fulsegang et al., 1997 ; (8) Huang et al., 1996 ; (9) Liu et al., 1994 ; (10) Liu et al., 1998 ; (11) Lonvaud-Funel et al., 1993 ; (12) Lonvaud-Funel et al., 1994 ; (13) Manca de Nadra et al., 1995 ; (14) Martineau et al., 1995 ; (15) Nielsen et al., 1997 ; (16) Sponholz et al., 1993].

Enfin, d'une manière générale, différents métabolismes sont à l'origine de la synthèse de composés qui n'ont pas d'incidence sur les qualités organoleptiques des vins, mais qui d'un point de vue toxicologique peuvent poser un problème tels que les amines biogènes et l'éthyle carbamate. Les amines biogènes sont produites au cours de la vinification principalement

durant la FML par des BL et dans une moindre mesure au cours de la FA. Une consommation excessive d'amines biogènes (histamine et tyramine plus particulièrement) peut être à l'origine de nombreux symptômes tels que des maux de tête, de l'urticaire, des troubles respiratoires, de la tachycardie, de l'hypertension, de l'hypotension et des vomissements. De plus, la putrescine et la cadavérine peuvent impacter négativement l'arôme des vins (Guo et al., 2015). L'éthylcarbamate est un composé classé parmi les cancérigènes du groupe 2A (= probablement cancérogènes pour l'Homme). L'urée et la citrulline sont des précurseurs de l'éthylcarbamate et sont liés au métabolisme de l'arginine de levures et de bactéries. En présence d'éthanol, ces précurseurs accumulés dans le vin conduisent à la formation d'éthylcarbamate (Ribéreau-Gayon, 2006).

II.3.2. Les bactéries acétiques

Les bactéries acétiques (BA), appartiennent la famille des *Acetobacteriaceae* et sont communément appelées bactéries du vinaigre. Elles sont à Gram-négatives et strictement aérobies. Elles sont omniprésentes dans l'environnement et retrouvées dans des habitats nombreux et variés (fleurs, fruits, légumes, vin, bière, vinaigre...). En œnologie, elles sont considérées uniquement comme des microorganismes d'altération (Drysdale et al., 1988 ; Fugelsang, 1997).

Deux genres de BA ont été identifiés dans le vin : (i) le genre *Gluconobacter* représenté par *Gluconobacter asaii*, *Gluconobacter frateurii* et *Gluconobacter oxydans* et (ii) le genre *Acetobacter* qui inclue 7 espèces dont 4 retrouvées fréquemment durant la vinification : *Acetobacter aceti*, *Acetobacter hansenii*, *Acetobacter liquefaciens* et *Acetobacter pasteurianus* (Du Toit et Pretorius, 2000). Les BA du genre *Gluconobacter* ont une préférence pour les environnements riches en sucre avec de faibles concentrations en éthanol. Elles sont donc plus fréquemment isolées sur des grappes endommagées et au cours des premières étapes de la FA. Le genre *Acetobacter* est plus tolérant à l'alcool et peut donc se développer dans le vin tout au long de la vinification, en particulier au cours de l'élevage. En effet, l'oxygénation du vin est un paramètre clé dans le développement des BA, qui peuvent atteindre rapidement des niveaux de population de l'ordre de 10^8 UFC.mL⁻¹ après des opérations induisant des apports non maîtrisés (Drysdale et Fleet, 1989).

Le développement de bactéries acétiques est à l'origine de nombreuses déviations organoleptiques (Tableau 2). Parmi elles, l'augmentation de l'acidité volatile, principalement

liée à la synthèse d'acide acétique est le défaut le plus redouté. La limite légale en acide acétique est de 1.4 g.L^{-1} , au-delà de cette concentration la commercialisation du vin peut être remise en question (Wilker et Dharmadhikari, 1997). Même si l'acide acétique peut modifier la perception du vin, ce sont principalement les esters acétiques et en particulier l'acétate d'éthyle, qui sont responsables de la perception de la pique acétique. L'acétate d'éthyle a une odeur souvent comparée à celle du vernis à ongles, son seuil de perception dans le vin est de 12.3 mg.L^{-1} et les vins atteints de pique acétique peuvent présenter des concentrations proches de 150 à 200 mg.L^{-1} (Boulton et al., 1996).

La production de dihydroxyacétone (DHA) à partir de glycérol en présence d'oxygène peut conduire à l'augmentation de la perception du caractère éthéré dans les vins. Le DHA est formé par céto-genèse du glycérol et peut réagir avec la proline en formant un composé à l'arôme de « croûte de tarte » (Fugelsang, 1997).

En présence de faible teneur en oxygène, les vins contenant des populations importantes en BA peuvent avoir des teneurs élevées en acétaldéhyde et acétoïne. L'acétaldéhyde (ou éthanal ou aldéhyde acétique) est un intermédiaire métabolique au cours de la production d'acide acétique à partir d'éthanol. Suite à la prolifération de BA, l'acétaldéhyde peut être retrouvé à des concentrations supérieures à son seuil de perception dans le vin (100 - 120 mg.L^{-1}) (Drysdale et al., 1989). Les descripteurs aromatiques de ce composé dans le vin sont la pomme verte, la noisette ou encore la cerise (Zoecklein et al., 1995).

Toujours en présence de faibles teneurs en oxygène, l'oxydation de l'acide acétique par des bactéries des genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* peut induire la formation d'acétoïne. Ce composé, tout comme le diacétyl possède un arôme lacté/beurré, avec cependant, un seuil de perception beaucoup plus élevé situé aux alentours de 150 mg.L^{-1} . Retrouvé à des teneurs comprises entre 3 et 31.8 mg.L^{-1} (Drysdale et Fleet, 1988 ; Boulton et al., 1996) son impact sur l'arôme des vins n'est pas direct, mais plutôt lié au fait qu'il est un composé clef des voies de biosynthèse du 2,3-butanediol et du diacétyl eux même majoritairement responsables de l'arôme de noisette et des notes beurrées, lactées dans le vin (Romano et Suzzy, 1996). Enfin, le DHA, l'acétaldéhyde et l'acétoïne sont tous les trois des composés capables de se combiner au SO_2 dans les vins, diminuant fortement son activité (Fugelsang, 1997).

Les déviations en œnologie concernent principalement la dégradation de composés d'intérêt, la synthèse de molécules ayant un impact négatif sur la perception aromatique, la modification des propriétés physiques des vins mais aussi dans certains cas un risque pour la santé du consommateur. L'existence de ces nombreuses déviations d'origine microbiologique montrent la nécessité d'utiliser des moyens de suivi et de contrôle microbiologique tout au long de la vinification.

III. Les procédés chimiques de stabilisation microbiologique des vins

Dans cette partie les principaux intrants œnologiques permettant d'assurer la stabilité microbiologique ainsi que certaines alternatives en cours d'étude sont présentées.

III.1. Le dioxyde de soufre

Dans la filière vitivinicole, le dioxyde de soufre (SO_2) de par ses propriétés antiseptiques, antioxydantes et antioxydasiques est l'intrant le plus utilisé par les vinificateurs. Le SO_2 est à l'heure actuelle le seul intrant (parmi ceux autorisés) qui exerce une efficacité à large spectre avérée pour la stabilisation microbiologique des vins (Lonvaud-Funel, 1999). Il est efficace contre l'ensemble des microorganismes identifiés en œnologie tels que les levures *Saccharomyces* et non-*saccharomyces*, les BL et BA (Bartowsky, 2009 ; Oelofse, Pretorius, et du Toit, 2008). L'utilisation généralisée du SO_2 sous forme de sulfites ou de bisulfites au cours des derniers siècles a fortement contribué à la diminution de l'incidence d'une grande partie des altérations d'origine microbiologique.

En solution aqueuse, le dioxyde de soufre est présent sous trois formes dont l'équilibre est dépendant principalement du pH, mais aussi de la teneur en éthanol et de la température. Ces trois formes sont la forme moléculaire (H_2SO_3), l'anion bisulfite (HSO_3^-) et l'ion sulfite (SO_3^{2-}) (Ribereau-Gayon et al., 2006). Au pH normal de vin (compris entre 3 et 4), l'anion bisulfite (HSO_3^-) est majoritaire (> 90 %) avec seulement 5% de SO_2 moléculaire (H_2SO_3) et une proportion négligeable de l'ion sulfite (SO_3^{2-}) (Romano et Suzzi, 1993). Le nom « SO_2 libre » fait référence à la portion non combinée du SO_2 dans le vin. En effet, dans le moût et le vin, le SO_2 peut se lier à des composés carbonylés (acétaldéhyde, anthocyanes, sucres, acide pyruvique ...) (Waterhouse et al., 2016). Le SO_2 combiné possède une activité antibactérienne 5 à 10 fois inférieure à celle du SO_2 moléculaire (mSO_2), cependant, il faut considérer qu'il peut être présent dans le milieu à des concentrations 5 à 10 fois plus importantes. Sous cette forme

son efficacité contre les levures est quant à elle négligeable (Ribereau-Gayon et al., 2006). La forme moléculaire (H_2SO_3), aussi appelée SO_2 actif, est celle qui exerce l'essentiel de l'activité antiseptique, sa présence étant favorisée par des pH bas. L'anion bisulfite (HSO_3^-), possède une faible activité antimicrobienne. Le mSO_2 diffuse passivement dans le milieu intracellulaire, le pH y étant plus élevé (environ 6.5), il y est converti en ion bisulfite (Macris et Markakis, 1974). Une fois dans le milieu intracellulaire, le SO_2 réagit avec de nombreux constituant tels que les enzymes, coenzymes, cofacteurs, acides nucléiques et vitamines bloquant ainsi les fonctions vitales du micro-organisme (Rose, 1989).

La réglementation européenne limite la concentration en SO_2 totale dans les vins ayant au maximum 5 g.L⁻¹ de sucres réducteurs à 150 mg.L⁻¹ pour les vins rouges et 200 mg.L⁻¹ pour les vins blancs et rosés (EU Réglementation No. 606/2009). Ces limites peuvent (i) augmenter de 50 mg.L⁻¹ pour les vins dont la teneur en sucres résiduels excède 5 g.L⁻¹ ou (ii) être réduite de 30 à 50 mg.L⁻¹ pour les vins « bio » (EU Réglementation No. 203/2012) (Lisanti et al., 2019).

Depuis une dizaine d'années, l'utilisation du SO_2 soulève certaines problématiques. Plusieurs études ont révélé que 1 % de la population mondiale présenterait une sensibilité accrue au SO_2 (Vally et Thompson, 2003). Cette sensibilité peut s'exprimer suite à la consommation de vin sous la forme d'un ou plusieurs des symptômes suivants : bronchospasme, bradycardie, symptômes gastro-intestinaux, urticaire et dans de rares cas des œdèmes de Quincke, de l'hypotension et des réactions anaphylactiques (Vally et al., 2009). De plus, plusieurs études ont notamment observé une augmentation de la fréquence des anomalies chromosomiques et de la présence de micro-noyaux (indicateurs d'anomalies chromosomiques) chez des souris exposées au SO_2 (Meng et al, 2004). En réponse à ces constats, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé une dose journalière maximale admissible (ADI) de 0.7 mg.kg⁻¹ (masse corporelle) (OMS, 2009). Au regard des limitations imposées par l'UE concernant l'utilisation du SO_2 , cette dose maximale journalière est difficilement atteinte et dépassée au cours d'une journée, cependant, la possibilité d'une toxicité due à une exposition journalière sur le long terme soulève des inquiétudes. La consommation de vin est l'un des facteurs les plus importants concernant l'exposition au SO_2 . En moyenne, chez un adulte la consommation journalière de 200 mL de vin contribuerait à 44 % de l'apport journalier admissible (OMS, 2009). Depuis novembre 2005, l'UE a rendu la mention « Contient des sulfites » obligatoire sur l'étiquette des vins contenant plus de 10 mg.L⁻¹ de SO_2 . L'évolution des connaissances sur

la toxicité du SO₂ et les réglementations qui en ont découlé ont soulevé de l'inquiétude chez les consommateurs. En effet, de nos jours la tendance est à la consommation de produits contenant le minimum d'intrants possible (notamment lorsqu'ils sont associés à certaines pathologies) et d'une manière plus générale à des produits ayant reçu peu ou pas de traitement physique ou chimique. Ce constat est en contraste avec certaines problématiques de la filière vitivinicole. En effet, même si la tendance est à la diminution de l'utilisation du SO₂ pour répondre à la demande des consommateurs, deux problématiques semblent indiquer que dans les années à venir les doses utilisées aujourd'hui pourraient ne plus être suffisantes pour assurer une efficacité équivalente du SO₂. Premièrement, en raison du réchauffement climatique, le pH moyen des vins est en constante augmentation ce qui a pour effet de diminuer l'activité antiseptique du SO₂ (Van Leeuwen et al ; 2016). Deuxièmement, plusieurs études font état de l'émergence de souches « tolérantes » ou « résistantes » au SO₂ parmi les espèces de microorganismes d'altération. Curtin et al., en 2012 ont montré que parmi 41 souches de *B. bruxellensis* isolées dans des vignobles australiens, 92 % de ces isolats présentaient un génotype corrélé à une tolérance au SO₂. Plusieurs isolats de ce groupe génétiques ont par la suite été isolés en France et Afrique du Sud (Avramova 2018). L'utilisation intensive depuis plusieurs dizaines d'années du SO₂, semble être à l'origine d'une pression sélective vis-à-vis de la sensibilité aux sulfites (Curtin et al., 2012). Aussi, la recherche d'alternatives est une nécessité.

III.2. Le diméthyle dicarbonate (DMDC)

Le diméthyle dicarbonate (DMDC) ou Velcorin® est un composé capable de réagir de façon irréversible sur les sites actifs d'enzymes cellulaires notamment sur les sites de l'alcool déshydrogénase et de la glyceraldehydes-3-phosphate déshydrogénase (Daudt et Ough, 1980 ; Porter et Ough, 1982). Cette propriété lui confère une action inhibitrice de l'activité fermentaire et donc sur la croissance des microorganismes. Le DMDC a démontré une action non seulement sur les levures de vinification mais aussi sur les levures d'altération et également sur les bactéries. Cependant, son effet bactéricide est moins important que son action fongicide (Ribéreau-Gayon et al., 2006). L'utilisation du DMDC au cours de la vinification est autorisée depuis 2006 par l'UE, pour la stérilisation à froid au moment de la mise en bouteilles de vins présentant au minimum 5 g.L⁻¹ de sucres résiduels. La dose maximale autorisée est de 200 mg.L⁻¹ (EU Réglementation EC No 606/2009). Son efficacité est fortement

dépendante des paramètres physico-chimiques du vin (température, pH et teneur en éthanol) (Terrell et al., 1993) ainsi que des conditions de son ajout et de la qualité de l'homogénéisation. En effet, dans le vin le DMDC s'hydrolyse très rapidement en méthanol et dioxyde de carbone. L'homogénéisation du vin au moment de son ajout joue donc un rôle important dans la réussite du traitement. De plus, cette importante réactivité et l'irréversibilité des liaisons sur les sites actifs des enzymes font que ce traitement ne permet pas d'assurer de protection dans le temps (Costa et al., 2008). Pour cette raison et parce qu'il ne possède pas de propriété antioxydante, le DMDC ne peut pas être utilisé seul en tant qu'alternative au SO₂. Cependant, son utilisation combinée à celle de sulfites peut permettre de diminuer les teneurs en SO₂ total dans les vins finis.

III.3. L'Acide sorbique

L'acide sorbique est un acide gras insaturé dont les propriétés fongicides sont largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire. Il agit comme un perturbateur des fonctions membranaires. Il est peu efficace contre les BL, les BA ainsi que les levures d'altération et donc essentiellement utilisé pour inhiber la croissance de *S. cerevisiae* dans des vins liquoreux afin d'éviter les problématiques de fermentation en bouteille (Fugelsang, 1997 ; Zoecklein et al., 1995). Son utilisation sous la forme de sels de potassium ayant une meilleure solubilité est autorisée par l'UE jusqu'à une teneur égale à 200 mg.L⁻¹. La dose fongicide permettant un mutage à l'acide sorbique est d'environ 5 g.L⁻¹, et l'ajout de 0.5 g.L⁻¹ n'induit qu'un ralentissement de la fermentation. L'acide sorbique ne peut donc pas être utilisé pour la vinification des vins doux (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Son utilisation aux valeurs réglementaires permet seulement l'inhibition de la croissance de levures dont les niveaux de populations sont faibles et doit être combinée avec celle du dioxyde de soufre à une concentration suffisante pour limiter les phénomènes d'oxydation et le développement de bactéries. L'acide sorbique ne doit pas être utilisé seul car son action est essentiellement fongicide et n'empêche donc pas le développement des bactéries. De plus, le métabolisme de l'acide sorbique par des BL conduit à la formation de 2-éthoxyhexa-3,5-diène, composé en partie responsable du « goût de géranium ». L'utilisation d'acide sorbique permet de renforcer l'action du SO₂ et éventuellement d'en réduire les ajouts, cependant, ce composé ne peut pas être considéré comme une alternative au SO₂.

III.4. Le lysozyme

Le lysozyme, aussi appelé muramidase est une enzyme retrouvée chez de nombreuses espèces animales et végétales et principalement isolée à partir de blanc d'œuf. Cette enzyme possède une action inhibitrice sur les bactéries à Gram positives en hydrolysant la liaison β -(1-4) entre l'acide N-acétylmuramique et N-acétylglucosamine qui constituent en partie leur parois cellulaires (Liburdi et al., 2014). Son mode d'action étant lié à la composition de la paroi cellulaire, le lysozyme présente une très forte efficacité contre les bactéries à Gram positives, mais une efficacité plus modérée contre les bactéries à Gram négatives (paroi cellulaire protégée par une membrane externe) et aucune efficacité sur les levures (plus généralement sur les cellules eucaryotes) (McKenzie et White, 1991). Son utilisation ne permet donc pas la gestion de problématiques liées au développement de levures d'altération ou de bactéries acétiques. Son mode d'action étant spécifique aux BL, il est principalement utilisé afin de (i) prévenir le développement des BL au cours de fermentations alcooliques languissantes (ii) pour la maîtrise du déclenchement des FML (blocage complet, retardement, traitement avant inoculation) et enfin (iii) limiter le développement de ces mêmes BL au cours de l'élevage (Lopez et al., 2009). L'activité enzymatique du lysozyme n'est pas impactée par la teneur en alcool du vin (Fugelsang, 1997) et son efficacité augmente avec la hausse du pH, lui conférant un avantage sur le SO_2 dans les vins à pH élevé. Cependant, et plus particulièrement dans les vins rouges, il peut réagir avec les composés phénoliques présents dans le milieu (tanins et anthocyanes) conduisant ainsi à une diminution de l'activité enzymatique, une modification de la couleur, une diminution de la teneur en polyphénols totaux et enfin à des phénomènes de précipitation. Cependant, aucun impact négatif sur la composante aromatique des vins n'a été démontré (Bartowsky et al., 2004). L'utilisation du lysozyme au cours de la vinification est autorisée depuis 2007 par l'UE et l'OIV pour des doses cumulées allant jusqu'à 500 mg.L^{-1} dans les moûts et les vins (EU Réglementation No. 606/2009). Cependant, en raison des propriétés allergènes du composé, pour la commercialisation de vins présentant des traces supérieures ou égales à 0.25 mg.L^{-1} , une mention faisant référence à l'ajout de lysozyme est obligatoire sur l'étiquette. Ne possédant aucune activité antioxydante et un mode d'action spécifique aux BL, l'utilisation de lysozyme ne suffit pas à elle seule à remplacer l'utilisation du SO_2 . Cependant, une utilisation combinée des deux composés permet le maintien d'une activité antioxydante, une protection à spectre large et une diminution des doses de SO_2 requises.

III.5. Autres intrants œnologiques à action germicide

Dans cette partie, nous discuterons, d'intrants ayant une activité germicide, mais dont l'utilisation en œnologie est autorisée pour une application autre que stabilisation microbiologique.

III.5.1. Le chitosan

Le chitosan est un polyoside composé de la distribution aléatoire de D-glucosamine liée en β -(1-4) et de N-acétyle-D-glucosamine. Il est produit par désacétylation chimique ou enzymatique de la chitine, composant de l'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette des céphalopodes ou encore de la paroi des champignons. Le terme « chitosan » décrit un groupe hétérogène de polymères combinant un ensemble varié de caractéristiques physico-chimiques et biologiques qui permettent un large éventail d'applications. Le chitosan est un additif autorisé et utilisé principalement afin limiter les phénomènes de casse ferrique et cuivreuse, mais aussi en tant que. Non-toxique, biocompatible et biodégradable (Raafat et Sahl, 2009), cet additif permet aussi l'élimination des métaux lourds et de l'ochratoxine A, une mycotoxine potentiellement cancérigène, néphrotoxique et immunodépressive présente dans les vins contaminés par *Aspergillus carbonarius* (Reg EC 606/2009). En œnologie, seule l'utilisation de chitosan produit à partir d'*Aspergillus niger* est autorisée. Au cours de la vinification, les propriétés antiseptiques du chitosan peuvent être utilisées dans le but de contrôler le développement de *B. bruxellensis* avec une dose maximale de 10 g.hL⁻¹ (International Code of Oenological Practices OIV/OENO, 338A/2009, 2009). Une étude publiée en 2016 a démontré l'efficacité du chitosan à une dose inférieure à la limite maximale autorisée. En effet, l'ajout de 8 g.hL⁻¹ de chitosan d'origine fongique a permis une réduction importante du niveau de population (approximativement 4 log) de *B. bruxellensis* dans des vins et des milieux de culture (Petrova et al., 2016). Cependant, ces travaux et d'autres (Ferreira et al., 2013 ; Taillandier et al., 2015), font état d'une élimination incomplète de *B. bruxellensis* et d'une absence de protection sur la durée qui se traduisent par une reprise de croissance dans les semaines qui suivent le traitement. De plus, Ferreira et al., en 2016 ont observé un impact du traitement sur la couleur des vins traités. Comme pour les autres intrants, le chitosan seul ne suffit pas à remplacer l'utilisation

du SO₂. Cependant, comme pour les additifs cités précédemment, son ajout permet de limiter l'utilisation de SO₂ au cours de la vinification.

III.5.2. Les composés phénoliques

L'ajout de composés phénoliques au cours de la vinification est une pratique autorisée et très courante, réalisée afin de modifier l'astringence et l'amertume des vins, d'en stabiliser la couleur et enfin en tant que clarifiant. Les principaux composés phénoliques du vin sont les flavanols, les tanins condensés (polymères de flavanols) et les anthocyanes (Waterhouse, 2002). Ces préparations commerciales sont produites à partir d'essences de bois variées (chêne, châtaignier, quebracho...), de pellicules et de pépins de raisin ou encore à partir de galles de plantes et de différents fruits. L'activité antiseptique des composés phénoliques du vin a été démontrée sur des microorganismes pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Salmonella enteritidis*...) (Papadopoulou et al., 2005 ; Silva et al., 2018). Mekoue Nguela et al., en 2019 ont démontré l'impact de deux fraction polyphénoliques (à 2 g.L⁻¹) sur les cinétiques de fermentation de 4 souches de *S. cerevisiae* (Y1, Y2, Y3 et Y4, Lallemand) en solution modèle. Ces ajouts le milieu fermentaire ont conduit à une diminution significative de la croissance cellulaire (50 %), du taux de production de CO₂ (60 à 80 %) et de la consommation d'azote (3 à 4 fois moindre) et à une augmentation des durées de fermentation. Les résultats concernant l'effet bactériostatique des composés phénoliques montrent des résultats parfois contradictoires. Les propriétés antibactériennes des composés phénoliques dépendent de la structure du composé, de sa concentration, de l'espèce et de la souche de microorganisme cible et enfin des propriétés chimiques du milieu (Garcia-Ruiz et al., 2008). D'une manière générale il semble que les composés phénoliques présentent des propriétés bactériostatiques uniquement à des concentrations très supérieures à celles retrouvées naturellement dans les vins (dizaine ou centaine de mg.L⁻¹). Lempereur et al., (2002) ont démontré la nécessité d'employer ces préparations à des doses très élevées (200 g.hL⁻¹) par rapport aux utilisations courantes pour voir apparaître un effet bactériostatique. De plus, à faible concentration, il a été montré que certains composés phénoliques tels que l'acide gallique et la (+)-catéchine peuvent agir en tant que stimulant de la croissance et du métabolisme bactérien (Reguant et al., 2000 ; Chasseriaud et al., 2015). L'utilisation de tanins œnologique n'est soumise à aucune limitation par l'UE, cependant, elle doit être réfléchi étant donné l'impact potentiel sur les propriétés organoleptiques des vins. De nos jours, les

mécanismes liés à l'activité antibactérienne des composés phénoliques ne sont pas entièrement compris. En raison du doute qui persiste sur l'efficacité de cette méthode, des doses très importants requises pour l'obtention d'un effet bactériostatique ou fongistatique et du potentiel impact de ces ajouts sur la qualité finale du produit, l'utilisation de cette technique pour la stabilisation microbiologique n'est pas encore une réalité.

III.5.3. Les β -glucanases

Les β -glucanases sont des enzymes utilisées en œnologie pour améliorer la clarification et la filtrabilité des vins et des moûts et en particulier lorsque ceux-ci sont issus de raisins contaminés par *Botrytis cinerea* (Villettaz et al., 1984). La membrane cellulaire des levures étant constituée de mannoprotéines entrecroisées avec des fibres de chitines et de glucane, l'utilisation de β -glucanases permet de stimuler la lyse cellulaire et donc la libération de composés intracellulaires et membranaires bénéfiques au cours de l'élevage des vins notamment lorsque celui-ci est réalisé sur lies (Van Rensburg et Pretorius, 2000). Les β -glucanases sont produites par fermentation immergée d'une souche sélectionnée non pathogène, non toxigène de *Trichoderma harzianum* et/ou *Reesei*, non modifiée génétiquement, en culture pure (UE Reg. EC 606/2009 ; International Code of Oenological Practices COEI-1-BGLUCA, 2004). L'efficacité antiseptique des β -glucanases a été évaluée sur différentes levures d'altération en milieu de culture (*Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus albidus*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia membranifaciens*, *Zygosaccharomyces bailii* et *Zygosaccharomyces bisporus*) (Enrique et al., 2010). Dans ces travaux l'utilisation de la dose recommandée pour la clarification et l'amélioration de la filtrabilité des vins ($45 \mu\text{g.mL}^{-1}$) n'a montré aucune efficacité anti levurienne. Cependant, l'utilisation de β -glucanases à 200 et $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a révélé une importante diversité interspécifique vis-à-vis de la sensibilité à l'action des β -glucanases. En effet, à $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, une inhibition de croissance de plus 90 % a été observée pour *B. bruxellensis* et *Z. bailii*, et étonnamment, même à une concentration de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ les β -glucanases n'ont induit aucune inhibition de croissance pour les autres espèces de levures étudiées. Cette variabilité pourrait être liée aux compositions hétérogènes des membranes cellulaires des différentes espèces (Nguyen et al., 1998). L'étude de l'efficacité des β -glucanases dans le vin sur *B. bruxellensis* et *Z. bailii* a révélé une diminution de l'efficacité par rapport au traitement équivalent en milieu de culture (Enrique et al., 2010). Les auteurs suggèrent un impact de la composition du vin sur les propriétés membranaires

des cellules ainsi qu'une diminution de l'efficacité de l'enzyme liée à la présence d'éthanol dans le milieu. Aucun impact du traitement sur les propriétés physico-chimiques des vins n'a été observé suite à l'ajout de β -glucanases, même à des doses jusqu'à 20 fois supérieures à celle recommandée par le fabricant (Enrique et al., 2010). Ces résultats montrent le potentiel des β -glucanases pour leur action anti levurienne. Cependant, leur efficacité diminuée dans le vin et leur efficacité spécifique à certaines espèces de levures, l'absence de propriétés antioxydantes et le manque de résultats concernant l'impact sur les vins du traitement avec des concentrations élevées (nécessaires pour un traitement efficient) font que les β -glucanases seules ne peuvent pas constituer une solution permettant d'assurer la stabilisation microbiologique des vins. Une fois de plus, cet intrant possède cependant, un intérêt dans le contexte d'une utilisation conjuguée à celle du SO_2 dans l'optique à nouveau de réduire les doses de sulfites utilisées au cours de la vinification.

III.6. Les intrants en cours d'étude pour la stabilisation microbiologique des vins

III.6.1. Les bactériocines

Les bactériocines sont des polypeptides dont la production est réalisée uniquement par certaines BL. Ces composés sont produits dans le ribosome et inhibent la croissance d'autres bactéries d'espèces similaires ou différentes en induisant une perméabilisation de la membrane conduisant à un déséquilibre osmotique et donc à la mort cellulaire (Jack, Tagg, et Ray, 1995). Les bactériocines ont une efficacité sur les bactéries à Gram positives, mais ne présentent peu ou pas d'intérêt contre les levures et les bactéries à Gram négatives (Marugg et al., 2009). Pour cette raison, l'utilisation de bactériocines est envisagée pour contrôler la croissance de BL dans le vin et notamment bloquer les FML lorsque celles-ci ne sont pas désirées. Combiné à l'utilisation du SO_2 , l'ajout de bactériocines pourrait offrir une action bactéricide complète (Gram+ et Gram-) (Rojo-Bezares et al. 2007). L'association de bactériocines, de SO_2 et de DMDC est envisageable pour un traitement de stabilisation microbiologique à spectre large avec des doses de SO_2 diminuées. Parmi les différentes bactériocines, seulement la nisine est considérée comme sans risque pour la santé, cependant, son utilisation n'est pas autorisée dans les pays membres de l'UE (EU Réglementation No. 606/2009).

III.6.2. Les Souches « Killer » de levures

Les levures « Killer » (K+) sont capables de produire et de sécréter dans le milieu extracellulaire des protéines ou glycoprotéines ayant une activité principalement fongicide. Le facteur « Killer » a été identifié chez plusieurs genres de levures liées à l'environnement vitivinicole : *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Torulaspota*, *Ustilago*, *Williopsis*, et *Zygosaccharomyces* (Lisanti et al., 2019). Généralement l'action des souches K+ de *S. cerevisiae* est spécifique à d'autres souches sensibles de *S. cerevisiae*, tandis que l'action des souches K+ d'espèce non-saccharomyces possède un spectre plus large et peut agir à la fois sur des espèces sensibles saccharomyces et non-saccharomyces (Heard et Fleet, 1987). Les mécanismes d'action de ces toxines sont principalement liés à leur liaison sur des récepteurs membranaires présents chez les souches de levure sensibles. Ces liaisons peuvent induire une modification de l'activité de transport transmembranaire et la poration de ces membranes (Van Vuuren et Jacobs, 1992). L'utilisation de souches K+ a un réel intérêt pour la diminution des doses de SO₂ utilisée au cours de la vinification, notamment celle des souches non-*Saccharomyces* qui présente un spectre fongicide plus large. Cette application des propriétés fongicides des levures K+ peut se faire par l'inoculation directe du moût ou du vin avec des souches de levure K+ sélectionnées. Cependant, si ces souches ne sont pas adaptées au vin, si leur capacité fermentaire est trop faible ou bien si elles possèdent des métabolismes associés à l'altération des vins, l'utilisation directe de toxines fongicides purifiées à partir de ces mêmes souches est envisageable (Comitini et al., 2004). L'utilisation de levures K+ est à réaliser avec précaution, en effet, la prolifération de ces levures peut entraîner un ralentissement ou un arrêt de fermentation si la souche utilisée pour réaliser la fermentation possède un phénotype sensible. De plus, sur le long terme, le développement de souches K+ dans l'environnement de vinification peut entraîner des complications pour la réalisation des fermentations les années suivantes.

III.6.3. Les nanoparticules d'argent

L'argent est utilisé pour ses propriétés antimicrobiennes depuis l'antiquité et son utilisation s'est répandue jusqu'à l'apparition des premiers antibiotiques (Silver, Phung, et Argent, 2006). Avec l'émergence de microorganismes résistants aux antibiotiques, l'intérêt pour les

propriétés antiseptiques de l'argent augmente. Actuellement, son utilisation est étudiée pour des applications biomédicales, la purification de l'air, l'industrie agroalimentaire, le secteur de la cosmétique, l'industrie textile et dans de nombreux produits ménagers (Marambio-Jones et Hoek, 2010). L'argent sous forme de nanoparticules possède une activité antibactérienne à spectre large sur des bactéries à Gram négative et Gram positive mais aussi des propriétés antifongiques et antivirales (Marambio-Jones et Hoek, 2010). Longtemps inconnus, de nos jours les trois mécanismes d'action les plus communément acceptés sont : (i) l'absorption d'ions d'argent libres dans le milieu intracellulaire induisant la perturbation de la synthèse d'ATP et des mécanismes de réplication de l'ADN, (ii) la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) à partir des nanoparticules d'argent, et enfin (iii) l'endommagement des membranes cellulaires causé par l'action physique des nanoparticules (Marambio-Jones et Hoek, 2010). L'utilisation d'argent sous forme de chlorure d'argent au cours de la vinification est autorisée depuis 2015 par l'UE pour l'élimination d'odeurs liées à des phénomènes de réduction. La limite d'utilisation est fixée à 1 g.hL^{-1} et les vins traités doivent présenter une teneur en résidus inférieure à 1 mg.L^{-1} avant leur commercialisation. L'ajout de chlorure d'argent se fait au moyen d'un support inerte (kieselguhr bentonite ou kaolin) qui doit être éliminée suite au traitement (Réglementation UE 2015/1576). Différentes études ont évalué les potentielles applications des propriétés antiseptiques des nanoparticules d'argent au cours de la vinification. Premièrement, Izquierdo-Canas et al., en 2012 ont comparé l'utilisation de 1 g.kg^{-1} de nanoparticules d'argent sous la forme de complexe colloïdale d'argent (CSC, pour Coloidal Silver Complex) à une addition de 50 mg.kg^{-1} de SO_2 (métabisulfite de potassium) dans du moût avant la FA (vins blanc et rouge). Aucune différence significative dans l'évolution des différentes populations de microorganismes suivies (levures, BL et BA) n'a été observée, révélant une efficacité similaire des deux traitements. De plus, toutes les fermentations se sont terminées en 13 jours n'indiquant aucune différence entre les cinétiques de fermentation suite à l'utilisation de SO_2 ou de CSC (Izquierdo-Canas et al., 2012). En 2014 des résultats similaires ont été obtenus concernant l'addition de CSC (1 g.kg^{-1}) sur des mouts avec cependant, une efficacité plus importante du traitement au CSC sur les BA (réduction de 2 log) par rapport à l'absence d'effet observé suite au traitement avec du SO_2 (Garde-Cerdan et al., 2014). De plus, cette étude s'est aussi intéressée à l'utilisation de CSC après la réalisation de la FML. Aucun des traitements post-FML (SO_2 30 mg.L^{-1} ou CSC 1 g.L^{-1}) n'a permis de maintenir

des populations faibles de BL. Dans cette étude le dénombrement des levures et des BA n'a pas été réalisé après FML. Pour les deux études citées précédemment, les analyses physico-chimiques et sensorielles n'ont pas révélé de différence majeure entre les vins traités au SO₂ ou au CSC. Cependant, les auteurs font état de phénomènes d'oxydation plus importants dans les modalités sans SO₂, liés à l'absence de propriétés antioxydantes des CSC. Enfin, les vins traités au CSC dans ces deux études présentaient tous une concentration inférieure à 0,1 mg.L⁻¹ de résidus d'argent et peuvent donc être considérés comme commercialisables. Concernant l'impact sur la santé de l'ingestion de nanoparticules d'argent, des travaux ont été réalisés pour évaluer la cytotoxicité de nanoparticules d'argent lié à du glutathion (GSH-Ag) et à du polyéthylène-glycol (PEG-Ag). Dans cette étude réalisée par Gil-Sanchez et al, en 2019, des cellules CaCo-2 (modèle de barrière épithéliale intestinale) ont été cultivées en présence de formes non digérées et digérées (*In vitro*) de GSH-Ag et de PEG-Ag. Malgré des concentrations en GSH-Ag et PEG-Ag (respectivement 440 mg.L⁻¹ et 309 mg.L⁻¹) très largement supérieures à la teneur maximale autorisée pour la commercialisation des vins (0.1 mg.L⁻¹) aucune modification de la viabilité cellulaire n'a été observée ce qui semble indiquer une absence de risque sur la santé. Les nanoparticules d'argent semblent posséder des propriétés antiseptiques à spectre large dans le vin et équivalentes à celles du SO₂, voir même supérieures en ce qui concerne le contrôle des populations de BA. Les premières études ne semblent pas indiquer d'impact majeur sur les qualités organoleptiques des vins ou de toxicité de cet additif même à des doses très supérieures aux limites instaurées par les réglementations. De même, l'absence de propriétés antioxydantes fait que cet intrant seul ne peut pas remplacer l'action complète des sulfites. De plus, la récupération et la régénération des nanoparticules après traitement sont des facteurs potentiellement limitants (Lisanti et al., 2019).

III.6.4. L'hydroxytyrosol

L'hydroxytyrosol (HT) ou 3,4-dihydroxyphényléthanol est un alcool phényléthylique qui possède des propriétés antiseptiques et antioxydantes ainsi que des vertus bénéfiques pour la santé (cardio protecteur, anti tumoral, anti-inflammatoire, anti-diabète, neuroprotecteur). Naturellement présent dans le vin, on le retrouve à des concentrations comprises entre 1,98 et 3.89 mg.L⁻¹ dans les vins rouges et entre 1.75 et 45 mg.L⁻¹ dans les vins blancs (Fernandez-Mar et al., 2012). En 2015, le potentiel de l'HT en tant qu'alternative au SO₂ a été évalué dans

une solution modèle de vin (Ruiz-Moreno et al., 2015). Concernant l'action antimicrobienne, l'utilisation d'HT à 80 mg.L⁻¹ a permis d'obtenir des résultats similaires à l'ajout de 80 mg.L⁻¹ de SO₂ pour *C. stellata*, *L. plantarum* et *A. aceti*. L'utilisation d'HT n'a eu aucun effet sur la croissance de *S. cerevisiae*, *H. uvarum* et *B. bruxellensis*. Enfin, l'HT a démontré une efficacité plus importante que le SO₂ sur *O. oeni*. À l'heure actuelle, peu d'étude fait état de l'activité antiseptique de l'hydroxytyrosol dans le vin. Concernant l'impact de cet additif sur les propriétés organoleptiques des vins, deux études portant sur l'élaboration d'un vin blanc et d'un vin rouge font état de phénomènes d'oxydation importants. En effet, dans ces travaux de Raposo et al, (deux études publiées en 2016) les vins sans SO₂, mais traités à l'HT, présentaient après 6 mois de conservation une modification significative de leur couleur et des profils aromatiques lourdement oxydatifs marqués notamment par la présence de phénylacétaldéhyde dont les descripteurs olfactifs sont la rose fanée et le miel (Raposo et al., 2016a ; Raposo et al., 2016b). Seul, l'HT malgré ses propriétés antioxydantes ne s'est pas avéré suffisant pour contrôler les phénomènes d'oxydation au cours de l'élevage des vins. De plus, l'activité anti microbiologique de l'HT, d'après Ruiz-Moreno et al. (2015) n'est pas efficace contre les levures et les bactéries acétiques. Son utilisation en tant qu'alternative complète au SO₂ au cours de la vinification ne semble pas réalisable à l'heure actuelle, cependant, son utilisation conjuguée à celle du SO₂ pourrait permettre de réduire les quantités de SO₂ ajoutées au vin.

III.6.5. Les acides gras saturés à chaînes courtes et moyennes

Certains acides gras saturés (AGS) sont des activateurs de la fermentation, cependant, les acides gras saturés à chaînes plus courtes, en particulier les acides en C8 et C10 possèdent une action anti-levurienne importante. Ces sous-produits issus du métabolisme fermentaire des levures peuvent être en partie responsables des difficultés observées en fin de fermentation (Ribéreau-Gayon et al., 2006). De plus, Guilloux-Benatier et al (1998) ont démontré que ces acides gras, ainsi que l'acide laurique, un acide gras saturé à chaîne moyenne (C12) peuvent également exercer une activité inhibitrice sur *O. oeni*. Les acides gras saturés affectent les membranes cellulaires des levures et bactéries en modifiant la perméabilité et entravant les échanges au travers de celles-ci. Ces propriétés, ainsi que leur totale innocuité et leur présence naturelle dans les moûts et vins, ont conduit à envisager leur utilisation comme alternative au SO₂. Dans une étude de Larue et al., (1986), l'utilisation d'AGS (C6, C8, C10 et

C12 en mélange) à une concentration de 9 mg.L⁻¹ en complément de SO₂ à 150 mg.L⁻¹ a permis le mutage d'un vin doux. Dans cette étude, le mutage sans ajout d'acides gras a nécessité une dose de 250 mg.L⁻¹ de SO₂, l'ajout d'AGS a donc permis une diminution de 100 mg.L⁻¹ du SO₂ requis ce qui n'est pas négligeable. Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude de Babikova et al, en 2011. L'effet de l'addition d'AGS (C8 à 3 mg.L⁻¹ et C10 à 6 mg.L⁻¹) en complément de SO₂ a été évalué. Les niveaux de population en levures viables dans les vins mutés avec l'ajout AGS (en complément du SO₂) étaient significativement plus faibles que dans les vins mutés seulement à l'aide du SO₂ (ordre de 10³ –10⁴ et plus). L'impact de ces ajouts a été évalué dans ces deux études, compte tenu du pouvoir odorant de ces acides gras ainsi que de leurs esters respectifs. Les auteurs ne font état d'aucune modification significative du profil aromatique des vins traités avec des doses inférieures à 10 mg.L⁻¹. Dans l'étude de Larue et al, (1986) une augmentation des acides gras et des de leurs esters respectifs est effectivement observée dans le vin, cependant, cette augmentation ne représente pas la totalité des acides gras ajoutés au moment du traitement. Les auteurs précisent qu'une grande partie des AGS reste fixée sur les membranes des levures et est donc éliminée pendant les opérations de clarification qui suivent le mutage. À l'heure actuelle l'utilisation des AGS n'a été évaluée que comme alternative au SO₂ dans le contexte d'un mutage. Les AGS, ne sont pour l'instant pas autorisés au cours de la vinification.

III.6.6. Les peptides antimicrobiens

En plus de son niveau d'adaptation élevé aux conditions du mout et du vin dans les premières étapes de la vinification *S. cerevisiae* dispose de mécanismes de défense qui lui confèrent un avantage supplémentaire sur les autres microorganismes. Parmi ces mécanismes, la synthèse de peptides antimicrobiens dans le milieu extracellulaire induit une action inhibitrice sur la croissance de plusieurs espèces de levures et bactéries. Les mécanismes inhibiteurs/germicides sont variés et dépendent du type de peptide étudié. Généralement, les propriétés inhibitrices des peptides antimicrobiens sont liées à des phénomènes de perméabilisation des membranes et parois cellulaires responsables de perturbations de la régulation du pH intracellulaire (Aumer, 2021 ; Struyfs et al., 2021). La production de différentes fractions peptidiques possédant ces propriétés a été révélée chez certaines souches de *S. cerevisiae* Nehme et al (2010). Plus tard Rizk et al., (2018) ont démontré les propriétés inhibitrices (en condition *in vitro*) de deux fractions peptidiques (5-10 kDa et 0,8-

2,42 kDA) produites par *S. cerevisiae* Uvaferm BDXTM sur la croissance d'*O. æni* et la réalisation de la FML. De la même façon, une fraction de 2 à 10 kDA produite par *S. cerevisiae* CCM1885 a démontré des propriétés fongistatiques et parfois fongicides sur plusieurs levures y compris *B. bruxellensis* (Albergia et al., 2010 ; Branco et al., 2019). Enfin, Enrique et al., (2007 et 2008) ont étudié les propriétés de peptides antimicrobiens synthétiques pour l'inhibition des différentes levures retrouvées en œnologie. Dans cette étude, l'utilisation de différents hexapeptides antifongiques et peptides dérivés de la lactoferrine a été évaluée pour leur activité fongistatique/fongicide sur différentes levures identifiées dans le vin. Plusieurs de ces peptides ont démontré une activité inhibitrice sur plusieurs levures en conditions in vitro, cependant, dans le vin et le moût le spectre d'inhibition des peptides est réduit. Par exemple, en solution modèle le peptide LfcinB₁₇₋₃₁ a démontré des propriétés fongicides sur l'ensemble des souches de *B. bruxellensis*. Cependant, dans le vin l'activité fongicide de ce peptide était limitée à quelques souches seulement. Pena et al., (2019), ont démontré qu'une fraction peptidique de masse inférieure à 5 kDA produite par *Candida intermedia* exprimait une activité fongicide envers *B. bruxellensis* sans affecter la croissance de *S. cerevisiae* dans le même milieu. Ces résultats démontrent que l'efficacité des peptides antimicrobiens est dépendant des propriétés physico-chimiques de la matrice ainsi que du microorganisme cible et potentiellement de son état physiologique. L'utilisation de peptides antimicrobiens pour la stabilisation microbiologique des moûts et vins présente un réel potentiel, notamment avec la possibilité d'exercer une action inhibitrice ou germicide ciblée sur un ou divers microorganismes par l'utilisation de peptides spécifiques seuls ou en mélange.

III.7. Conclusions

La plupart des intrants alternatifs présentés démontrent des propriétés intéressantes contre les microorganismes d'altérations présents dans le vin. Cependant, pour différentes raisons aucun d'entre eux ne peut s'affirmer comme une alternative complète au SO₂ car le principal manque de ces produits est leur absence de propriétés antioxydantes et antioxydasiques. De plus, la plupart démontrent une activité anti microbienne spécifique envers un ou plusieurs microorganismes mais aucun ne présente l'action germicide à spectre large offerte par l'utilisation du SO₂. Enfin, certains d'entre eux semblent avoir un impact non négligeable sur les propriétés sensorielles du vin et potentiellement sur la santé des consommateurs. Toutefois, il apparaît que l'utilisation de ces nouveaux intrants pourrait à terme servir à limiter

les doses de SO₂ utilisées au cours de la vinification. De cette façon, le DMDC, l'acide sorbique et le lysozyme sont déjà autorisés comme alternative ou complément au SO₂ pour des applications spécifiques au cours de la vinification. Il serait pertinent de coupler ces intrants avec l'ajout d'autres molécules à forte capacité antioxydante.

IV. Les procédés physiques de stabilisation microbiologique des vins

A l'heure actuelle, la stabilisation microbiologique des vins via l'emploi de techniques physiques est essentiellement réalisée par filtration ou bien traitement thermique. Au cours des dernières années, plusieurs technologies émergentes ont été utilisées avec succès pour éliminer les micro-organismes dans des domaines variés. Le transfert de certaines de ces techniques innovantes vers la filière vitivinicole pourrait permettre d'apporter des solutions supplémentaires à la problématique de réduction des doses de dioxyde de soufre. Par rapport aux additifs chimiques, l'utilisation de méthodes physiques donne une image qui correspond davantage aux exigences des consommateurs. Parmi ces méthodes innovantes en cours d'étude on retrouve les traitements haute pression, les ultrasons, les champs électriques pulsés, les ultrasons, les micro-ondes, le chauffage ohmique et enfin deux techniques basées sur l'utilisation du rayonnement les UV-C et la lumière pulsée.

IV.1. Les procédés physiques conventionnels

IV.1.1. La microfiltration

La filtration est le procédé physique le plus utilisé actuellement en œnologie pour la stabilisation microbiologique. La microfiltration peut être réalisée selon deux modes opératoires différents qui sont la filtration frontale ou bien la filtration tangentielle (Figure 1). Pour la filtration frontale, le liquide circule perpendiculairement au travers du media filtrant tandis le flux est parallèle à la surface filtrante dans le cas de la filtration tangentielle.

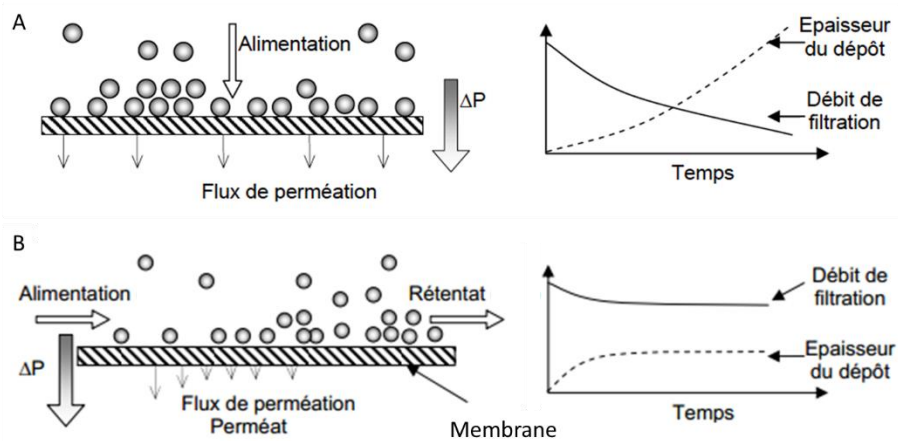


Figure 1 : Représentations des fonctionnements (A) de la filtration frontale et (B) de la filtration tangentielle. (Source : Tel archives ouverte)

La filtration frontale peut être réalisée de différentes façons:

La filtration sur précouche de diatomées (ou Kieselguhr) aussi appelée « Filtration sur terres » au moyen d'un filtre à alluvionnage continu (filtre-presse et filtres rotatifs sous vide). Lors de la filtration sur précouche, les diatomées sont en permanence ajoutées au vin avant d'être retenues sur un support sur lequel elles vont constituer une couche filtrante (Ribéreau-Gayon et al., 2006). L'épaisseur de cette couche filtrante grandit tout au long du traitement et sa couche externe est constamment renouvelée (Figure 2). Les impuretés présentes dans le vin se retrouvent donc piégées dans la masse et la couche externe n'est jamais colmatée, car constamment renouvelée. En général cette technique de filtration est réservée à la clarification des vins bruts et constitue l'une des premières étapes de préparation à une filtration plus fine. De plus 100 à 200 g.hL⁻¹ de résidus de filtration sont générés au cours d'un alluvionnage ce qui constitue un problème environnemental (Mietton-Peuchot, 1998). Enfin l'utilisation des terres de diatomée implique une grande précaution étant donné qu'elles contaminent l'atmosphère dans laquelle elles sont manipulées (particules fines).

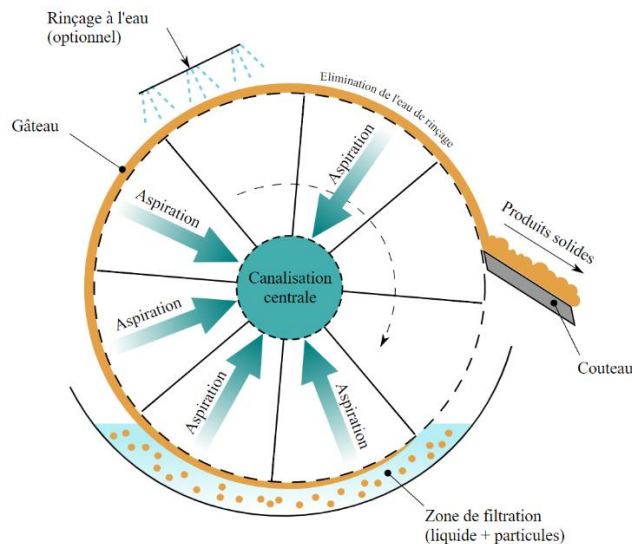


Figure 2 : Exemple de filtration sur précouche, fonctionnement d'un filtre rotatif sous vide.

La filtration sur plaques de cellulose est très largement utilisée pour assurer la limpidité et la stabilité microbiologique des vins avant leur mise en bouteille. Elle consiste en la superposition d'un nombre variable de plaques filtrantes composées de fibres cellulosiques d'origine végétale, associées à des composés granuleux (diatomées ou perlite) de porosités variables et éventuellement des résines cationiques qui en modifient la charge électrique et donc les capacités d'adsorption. Ces plaques peuvent être placées dans un filtre à plateaux ou bien dans un filtre clos, appelé filtre lenticulaire qui limite les risques de fuite. L'utilisation de plaques stérilisante permet une quasi-stérilité du vin, mais nécessite en amont une ou plusieurs étapes de clarification des vins (collage, sédimentation, centrifugation, filtration dégrossissante...) étant donné le risque important de colmatage lié à leur très faible perméabilité. L'affranchissement des plaques avant le passage du vin est nécessaire afin d'éviter l'apparition de goût de carton dans celui-ci. Les plaques de filtrations ne peuvent être régénérées et constituent donc un déchet après filtration (MatéVi, 2003).

La microfiltration sur cartouche préfiltre et membrane (filtres à cartouche) avec des diamètres de pores compris entre $0.45 \mu\text{m}$ et $1.2 \mu\text{m}$ permet l'obtention de la stérilité ou de s'en rapprocher en fonction du diamètre de pores choisi. Les membranes de microfiltration sont constituées d'une mince couche filtrante déposée sur un support. Il existe une grande variété de ces membranes, celles-ci peuvent être d'origine organique (diacétate ou triacétate de cellulose), élaborées à partir de polymères synthétiques (polyamide/polyimide, polyvinylidène, polytétrafluoroéthylène, polypropylène...) ou bien constituées de couches de

céramique poreuses (oxyde d'aluminium, zirconium, titane, métal fritté, carbure de silicium...). La perméabilité de ces membranes est très variable en fonction du matériau utilisé, du nombre et de la taille des pores et enfin de la surface filtrante (MatéVi, 2003).

Le colmatage des médias filtrants par les particules en suspension, les polysaccharides, les polyphénols et les protéines contenus dans les vins est le principal facteur limitant au cours de la filtration. Ce phénomène entraîne une baisse de la perméabilité des membranes à l'origine d'une diminution de la productivité et de l'efficacité du procédé (Figure 1). Ces phénomènes peuvent induire une rétention importante de composés d'intérêt et altérer la qualité des vins (El Rayess et al., 2011). Contrairement à la filtration frontale où le flux est perpendiculaire à la surface filtrante, dans la filtration tangentielle, le flux est horizontal au média filtrant (Figure 1). Le vin grâce à un phénomène de surpression passe au travers de la membrane, cependant, les particules arrêtées ne s'accumulent pas, car elles sont constamment entraînées par le flux. La filtration tangentielle permet de ralentir l'apparition des phénomènes de colmatage et de faciliter ainsi les opérations de filtration stérilisante (El Rayess et al., 2011). Par rapport aux techniques traditionnelles, la microfiltration tangentielle confère les avantages suivants : (i) la possibilité de réaliser une clarification, une stabilisation microbiologique et/ou une filtration stérile en une seule opération continue ; (ii) la réduction des pertes de vin et des coûts énergétiques par la substitution de plusieurs traitements de filtrations traditionnelles en une seule opération et enfin (iii) l'élimination des adjuvants de filtration (El Rayess et al., 2011).

Avant de considérer l'impact de la filtration sur la qualité des vins, il est nécessaire d'évoquer certains aspects qui relèvent plus de l'erreur de manipulation que de l'impact du procédé en lui-même :

- Le goût de carton ou de terre lié à un affranchissement insuffisant des adjuvants de filtrations.
- Le relargage dans le vin de molécules odorantes adsorbées par des adjuvants de filtration conservés dans de mauvaises conditions.
- Une oxydation importante des vins liée à une gestion insuffisante des gaz dissous ou un problème technique au cours de la filtration.

- Une mauvaise adéquation entre les propriétés physico-chimiques du vin et le choix des techniques et des matériaux de filtration qui résulte en un colmatage prématuré des surfaces filtrantes.
- Répétition exagérée des opérations de filtration au cours de la vinification.

Différentes études portant sur la microfiltration de vins blancs ont démontré une diminution de la teneur en composés phénoliques de ces vins (Flores et al. 1990 ; Goodwin et al., 1991). Cette observation est souvent corrélée à une diminution de la DO_{420} ainsi que de l'intensité colorante. De plus, selon les études ces modifications ont été ou non perçues à la dégustation à travers la perception des sensations en bouche (astringence, amertume, « corps »). Arriagada-Carrazana et al, (2005), ont étudié l'impact de la microfiltration membranaire (préfiltre Polypropylène 1.2 μm et membrane polyfluorure de vinylidène PVDF 0.65 μm) sur des vins de Cabernet Sauvignon. Les auteurs ont montré une diminution de l'ordre de 10 % des polyphénols totaux dans les vins filtrés ce qui est corrélée avec une diminution des tanins totaux, des anthocyanes totales ainsi qu'une diminution de l'intensité colorante. L'analyse de la composition volatile de ces vins a révélé des différences significatives avant et après filtration pour une dizaine de composés d'origines chimiques variées (Alcools supérieurs, phénols, cétones, aldéhydes, acides et alcanes) parmi une centaine de composés étudiés. La réalisation de test triangulaire sur ces vins a révélé des différences significatives sur les sensations en bouche ainsi qu'au niveau de l'intensité aromatique. Buffon et al., 2014 ont étudié l'impact d'une microfiltration tangentielle (membrane asymétrique en polyéthersulfone 0.2 μm) à l'échelle industrielle sur un vin blanc et un vin rouge (filtration de 10 hL de chacun des vins). Aucune différence significative n'a été perçue à la dégustation pour le vin blanc malgré une diminution significative de la DO_{420} dans les modalités filtrées (36 % en moyenne par rapport au témoin non filtré). En ce qui concerne le vin rouge, une diminution allant jusqu'à 10 % de la DO_{420} et de la DO_{520} a été observée dans les volumes filtrés. De plus le témoin non filtré présentait des teneurs en anthocyanes et tanins significativement plus élevées que celles des vins filtrés (jusqu'à 10 % et 26 % respectivement). Concernant l'analyse sensorielle de ces vins aucune différence n'a été perçue au cours des deux premiers mois suivant la filtration, cependant, l'évolution du témoin non filtré s'est ensuite caractérisée par

(i) une augmentation des caractères boisé, terreux, fumé et herbacé et (ii) une diminution des notes fruitées (fruits rouges et noirs).

Cependant, le nombre d'études portant sur l'impact de la filtration (notamment à l'échelle industrielle) sur les vins est étonnamment rare étant donné l'utilisation massive de ces techniques en œnologie. De plus, la grande diversité des techniques de filtration et des médias filtrants rend la synthèse bibliographique difficile sur ce sujet. Les études menées ont été essentiellement réalisées à l'échelle du laboratoire et leurs conclusions sont variées. Cependant, lorsque des différences sont observées elles indiquent généralement un potentiel impact sur la composition phénolique des vins filtrés, parfois corrélée avec une modification de la couleur et des sensations en bouche.

IV.1.2. Le traitement thermique

Le traitement des vins par la chaleur est une autre possibilité pour assurer sa stabilité microbiologique. La température est l'un des paramètres les plus influents sur l'activité et la viabilité des microorganismes. L'exposition des microorganismes à des températures élevées conduit à l'inhibition des activités cellulaires, la dégradation/destruction des membranes plasmiques et donc à la mort de la cellule. Chaque espèce présente une tolérance différente à la chaleur en fonction de ses propriétés physiques et chimiques, mais aussi en fonction de l'environnement et de l'adaptation dont peuvent faire preuve les microorganismes (Milani et al., 2015). Les différents traitements thermiques du vin sont la flash-pasteurisation, la thermolisation (mise en bouteille à chaud), et de manière plus anecdotique la pasteurisation des vins en bouteilles. Ces techniques sont principalement utilisées au moment du conditionnement des vins en bouteilles étant donné le risque important de recontamination lié à l'impossibilité de conserver stérilement les vins sur de longues périodes. La flash-pasteurisation est le traitement thermique le plus répandu, elle s'opère généralement à l'aide d'échangeurs thermiques. Les vins sont rapidement chauffés à plus de 60 °C pendant quelques secondes puis directement refroidis. La flash pasteurisation est généralement suivie d'une étape de filtration pour éliminer les microorganismes inhibés avant la mise en bouteille. A ma connaissance aucune étude récente n'a cherché à évaluer l'impact des procédés thermiques de stabilisation microbiologique sur les propriétés organoleptiques des vins.

IV.2. Les procédés physiques innovants de stabilisation microbiologique des vins

IV.2.1. Les Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH)

Le procédé à Haute Pression Hydrostatique (HPH) est une méthode de conservation athermique qui consiste en l'application de pression comprise entre l'ordre de 100 à 1000 MPa sur un produit alimentaire conditionné. L'aliment solide ou liquide est soumis une très haute pression à l'aide d'un milieu transmettant la pression (généralement de l'eau) qui favorise l'homogénéité du traitement (Santos et al., 2016). Le mécanisme d'action du procédé HHP est lié à la rupture des liaisons non covalentes (liaisons hydrogène, ioniques et hydrophobes) au sein de molécules à haut poids moléculaire. Les composants de bas poids moléculaire sont normalement moins affectés (Nunes et al., 2017). Ces ruptures induisent une modification de la structure tertiaire de ces molécules et donc la perte de leurs fonctionnalités ce qui résulte en l'inhibition des microorganismes affectés. Des études ont montré que des pressions comprises entre 200 et 500 MPa permettent l'inactivation des levures et des bactéries à la fois dans des vins blancs et des vins rouges, sans en modifier les propriétés organoleptiques (Buzrul, 2012 ; Mok et al., 2006 ; Gonzalez-Arenzana et al., 2016). Cependant, d'autres travaux réalisés avec des traitements plus intenses (supérieurs à 650 MPa) ont révélé après 5 à 6 mois de conservation des modifications des caractéristiques chromatiques (augmentation DO_{420} et diminution DO_{520}) ainsi qu'une diminution des teneurs en composés phénoliques et de l'activité antioxydante dans les vins traités (Christofi et al., 2020). Il a également été rapporté que les vins pressurisés contiennent des quantités plus élevées de furanes (2-furfural), d'aldéhydes et de cétones. Les auteurs concluent que le traitement par HPH accélère les réactions de Maillard et l'oxydation des acides gras et des alcools supérieurs donnant lieu à diminution des caractères fruités et floraux et une augmentation des notes de fruits cuits et d'épices (Santos et al., 2015, 2016 et 2019).

Les applications des HPH en œnologie restent limitées en fonction des contraintes qui lui sont liées : (i) traitement par batch ; (ii) nécessité de traiter des produits déjà conditionnés ; (iii) limité à des emballages flexibles. De ce fait, l'utilisation de ce procédé n'est envisageable qu'au moment du conditionnement de vin. Enfin, cette technologie représente un investissement considérable pour les producteurs.

IV.2.2. Les champs électriques pulsés

Le traitement par champs électriques pulsés (CEP) est basé sur l'application de courtes impulsions électriques (de l'ordre de la microseconde) de haute tension (5-10 kV.cm⁻¹) sur un produit alimentaire placé ou en circulation entre deux électrodes (Pataro et al., 2010). Les propriétés germicides des CEP sont liées aux phénomènes d'électroporation temporaires ou permanents induits par le champ électrique appliqué. Ces phénomènes d'électroporation correspondent à l'apparition de pores (temporaires ou permanent en fonction de l'intensité du champ électrique) qui en conséquence augmentent la perméabilité cellulaire. Une augmentation de l'intensité du traitement, en termes d'intensité de champ électrique et de largeur ou de nombre d'impulsions, favorise la formation de pores plus larges ainsi qu'une proportion plus importante de dommages irréversibles. L'intensité du champ électrique critique pour l'électroporation des cellules microbiennes (diamètres de 1 à 10 µm) est de l'ordre de 10 à 15 kV.cm⁻¹ (Toepfl et al., 2006). L'efficacité de cette technologie dans le vin a été démontrée par Delsart et al., (2016) suite à l'inactivation dans un vin rouge de *O. oeni*, *B. bruxellensis* et *P. parvulus* sous 20 kV.cm⁻¹ et 320 kJ.L⁻¹. Les auteurs montrent que les paramètres physicochimiques du vin traité par CEP à 320 kJ.L⁻¹ n'ont pas été modifiés suite au traitement. Les mêmes auteurs ont aussi démontré que le traitement par CEP pouvait permettre de réduire la dose de SO₂ nécessaire au mutage d'un vin blanc dans le cadre de la vinification d'un vin liquoreux (Delsart et al., 2015). De premiers essais de stabilisation microbiologique des vins par utilisation de champs électriques pulsés en conditions semi-industrielles (4 à 12 h.L.h⁻¹) ont été réalisés et ont montré des résultats très encourageants (Davaux et al., 2019) Le mutage des vins par utilisation de CEP a permis un arrêt instantané de la FA sans utilisation de SO₂. Des réductions des populations levuriennes comprises entre 2 et 4 log ont été obtenues en fonction des caractéristiques des traitements appliqués. Ces résultats ont été obtenus avec une élévation de la température du vin (40 °C à 50 °C) plus faible que celle observée au cours d'une flash pasteurisation (76 °C). Le traitement de vins naturellement contaminés ou inoculés, a permis dans tous les cas de réduire les populations à des concentrations inférieures à 1 UFC pour 100 mL, même avec des niveaux de populations initiales de l'ordre de 10⁴ UFC.mL⁻¹. L'efficacité des CEP pour la stabilisation microbiologique des vins a été démontrée à plusieurs reprises, cependant, son impact sur les vins est encore mal caractérisé. Le traitement par CEP induit une augmentation de température du produit

proportionnelle à l'énergie appliquée. Par conséquent, des temps de repos pendant le processus discontinu ou un refroidissement après un traitement en flux continu sont nécessaires afin de protéger les molécules thermosensibles du vin (Delsart et al., 2015). De même, l'impact de la libération de métaux tels que Fe, Cr, Zn et Mn par les électrodes en contact avec le vin doit être envisagé et étudié (Yang et al., 2016), car ces composés, même à faible concentration peuvent catalyser des réactions d'oxydation (Waterhouse et Laurie, 2006). Le traitement par CEP a été largement étudié pour ses potentielles applications au cours de la vinification en ce qui concerne sa capacité à favoriser l'extraction lors des phases pré fermentaires mais aussi pour son utilisation pour la stabilisation microbiologique. La réalisation des premiers essais à l'échelle semi-industrielle démontre l'avancée des travaux et l'intérêt de la filière pour ce procédé. Cependant, l'impact des traitements par CEP sur le vin et notamment sur leur composition volatile nécessite davantage de travaux.

IV.2.3. Le chauffage ohmique

Le chauffage ohmique est un procédé de stabilisation thermique basé sur la circulation d'un courant électrique dans un produit alimentaire présentant une résistance électrique. Contrairement aux autres procédés thermiques, ce procédé n'implique pas de phénomène de conduction, de convection ou de radiation. Ceci limite « l'effet paroi » et améliore grandement l'homogénéité de la distribution de l'énergie calorifique (Junqua et al., 2021). En effet, la chaleur est obtenue par conversion du courant électrique (effet Joule) qui circule au sein du produit traité. Cela permet une diminution du risque de détérioration des aliments, une diminution des temps de traitement et un meilleur rendement énergétique (Yildiz et al., 2009). Le chauffage ohmique présente deux mécanismes germicides, (i) un mécanisme thermique (inhibition de l'activité intracellulaire/rupture des membranes et parois cellulaires) et un mécanisme athermique lié à la présence d'un champ électrique responsable d'une augmentation de la perméabilité membranaire des microorganismes par phénomène de poration (Lebovka et al., 2007). Le traitement par chauffage ohmique peut être réalisé en batch ou en continu et est adapté au traitement des matières solides et liquides.

Des traitements en batch et en continu de moût de raisin rouge ont montré que le chauffage ohmique, grâce à l'homogénéité de traitement et aux effets d'électroporation, permet d'inactiver significativement plus de microorganismes indigènes que les procédés thermiques conventionnels à des températures équivalentes (60 °C et 72 °C). Les vins obtenus après

vinification de ces moûts traités n'ont pas montré de différences significatives au niveau sensoriel malgré des teneurs en polyphénols totaux et en esters significativement supérieures (Junqua, 2017). Une étude portant sur l'utilisation du chauffage ohmique en tant qu'alternative au mutage par SO₂ a été réalisée sur des moûts blancs liquoreux. Les traitements par chauffage ohmique ont permis l'arrêt de fermentation (réduction de 7 log des levures totales) à 60 et 72 °C. Malgré une casse protéique observée au moment des traitements, les vins issus de ces moûts n'ont pas montré de différences significatives d'un point de vue physico-chimique et sensoriel (Junqua, 2017). Des essais sur vins finis ont également été menés (Merlot à 60 °C et 72 °C), dans les deux cas l'inactivation complète des levures totales et bactéries totales présentes dans les vins avec respectivement des réductions de 4 log (levures totales) et de 7 log (bactéries totales). Malgré une diminution significative de l'ordre de 10 % des esters éthyliques et des acétates d'alcools supérieurs, aucune différence significative n'a été révélée d'un point de vue sensoriel (Junqua, 2017). Les premiers résultats concernant l'application du chauffage ohmique pour la stabilisation des vins sont prometteurs, mais des études complémentaires sont nécessaires afin d'en évaluer l'impact sur les propriétés organoleptiques des vins traités.

IV.2.4. Les ultrasons

La technologie des ultrasons est basée sur des ondes mécaniques à une fréquence supérieure à la limite supérieure de l'audition humaine (>16 kHz) qui sont transmises à travers toute substance possédant des propriétés élastiques (Ferraretto et al., 2013). Dans l'industrie alimentaire, les ultrasons peuvent être divisés en deux gammes de fréquences : les ultrasons à haute fréquence (100 kHz – 1 MHz) et les ultrasons de haute puissance (UHP) (16 – 100 kHz). Les ultrasons à haute fréquence sont couramment utilisés comme technique analytique pour fournir des informations sur les propriétés physico-chimiques des aliments telles que la maturité, la teneur en sucre, l'acidité (Demirdoven et Baysal, 2008). Les UHP peuvent être utilisés pour générer des émulsions, disperser matériaux agrégés pour leurs propriétés germicides (Knorr et al., 2004 ; Tiwari et al., 2010). Appliqués à un liquide, les UHP produisent des effets à la fois chimiques et physiques résultant de phénomènes de cavitation qui correspondent à la formation et l'effondrement de microbulles à haute énergie (Maisonhaute et al. 2002). Ces phénomènes de cavitation génèrent des hausses localisées de la température pouvant atteindre 5 500 °C et de la pression jusqu'à 50 MPa (Leighton 1998). Ces phénomènes

de cavitation sont aussi à l'origine d'ondes de choc et de forces de cisaillement qui ont pour effet de briser les membranes cellulaires. De plus, l'irradiation UHP de solutions aqueuses peut produire des espèces radicalaires hautement réactives telles que les radicaux $\text{OH}\cdot$ et $\text{H}\cdot$, qui peuvent par la suite mener à la production d' H_2O_2 toxique sur pour microorganismes (Chemat et al., 2011). Les applications des UHP dans l'industrie agroalimentaire sont nombreuses et basées à la fois sur les effets physiques et chimiques induits par le procédé (Knorr et al. 2004). Ces applications comprennent la réalisation d'opération de dégazage et d'extraction, l'induction de réactions d'oxydation/réduction, l'inactivation et la nucléation d'enzymes au cours de processus de cristallisation, le nettoyage et la désinfection de surfaces variées et de l'intérieur de structures poreuses, la réduction de la granulométrie et de la variabilité des suspensions liquides (désagrégation) ou encore le désencrassement de filtres variés. En vinification, les UHP ont été essentiellement étudiés pour des applications autres que la stabilisation microbiologique telles que : (i) pour améliorer l'extraction des composés phénoliques des peaux et pépins de raisin (Bautista-Ortín et al., 2017) ; (ii) pour accélérer le processus de vieillissement du vin (Zhang et al., 2015 et 2016 ; Chang et al., 2002), car les températures et pressions élevées générées par les phénomènes de cavitation peuvent induire et accélérer certaines réactions chimiques qui se produisent naturellement au cours de vieillissement du vin ; (iii) pour l'assainissement des barriques afin d'éliminer les dépôts de tartre et les microorganismes logés à la surface et dans les pores du bois (Breniaux et al 2019). L'effet germicide des UHP a été démontré pour un grand nombre de microorganismes (bactéries, levures, moisissures, algues...) (Jiranek et al., 2007). Concernant les microorganismes identifiés en œnologie Luo et al, (2012) ont démontré une sensibilité accrue aux UHP chez les levures par rapport aux bactéries. Cette étude révèle aussi des niveaux de sensibilité variables entre les différentes levures, avec par exemple *S. cerevisiae* qui exprime une sensibilité plus importante au traitement que *B. bruxellensis*. De plus, en général, l'impact du procédé sur les populations de microorganisme était moins important dans le vin et le jus de raisin que dans une solution modèle. Tsukamoto et al. (2004) ont montré que le taux d'inactivation des cellules de levure *S. cerevisiae* était fonction de l'amplitude de l'onde ultrasonore et du niveau initial de population, les traitements les plus efficaces étant ceux réalisés aux amplitudes les plus élevées et sur les populations microbiennes initiales les plus faibles. Selon ces résultats, l'efficacité de la stabilisation par UHP est donc dépendante des

microorganismes ciblés, de leurs niveaux de population, de la nature du produit traité et des caractéristiques (fréquences et amplitude) des ultrasons appliqués.

Les travaux portant sur la stabilisation microbiologique de vin par UHP et sur l'impact de ces mêmes traitements sur les propriétés organoleptiques des vins sont rares. Dans une étude de Gracin et al en 2016 le traitement par UHP de vin dans un réacteur continu a montré une efficacité satisfaisante sur des levures *B. bruxellensis* (réduction de 89,1 % à 99,7 %) et des BL (réduction de 71,8 % à 99,3 %). Cependant, l'analyse sensorielle des vins traités a révélé l'apparition d'arômes oxydatifs, de brûlé et de fumée. Plus récemment, deux études de Lukic et al., (2019 et 2020) ont révélé un potentiel impact du traitement UHP sur la composition phénolique et volatils de vins blancs et rouges. Cependant, l'intensité de cet impact sur la qualité du vin a pu être diminuée par l'utilisation de doses modérées de SO₂ et de glutathion. À l'heure actuelle, les UHP sont essentiellement étudiés pour l'extraction des composés phénoliques et la désinfection des barriques. Les premiers résultats sur leur application pour la stabilisation microbiologique des vins montrent de bons résultats d'un point de vue microbiologique, cependant, l'intensité des traitements requis pour la stabilisation des vins induit des modifications importantes et négatives de la qualité de ces derniers. L'utilisation des UHP seuls ne semble pas encore envisageable, cependant, son emploi est uniquement considéré à des intensités modérées en co-traitement avec d'autres procédés ou intrants.

IV.3. Conclusion

Les techniques de filtration et de traitement thermiques sont les seuls procédés utilisés au cours de la vinification permettant d'assurer la stabilité microbiologique des vins. Ces techniques ont fait leurs preuves et sont largement répandues. Cependant, pour répondre à la problématique de réduction des intrants, la filière vitivinicole a besoin de nouvelles alternatives permettant d'assurer la stabilisation microbiologique des vins. De nouvelles techniques issues de domaines variés sont en cours d'étude et parmi l'ensemble des procédés cités précédemment, tous ne possèdent pas le même potentiel d'application pour la vinification. Les hautes pressions en raison de leur coût de revient important et de contraintes spécifiques (batch, produit conditionné) ne présentent un réel intérêt que pour une petite partie des producteurs. Les ultrasons ainsi que le chauffage ohmique sont des procédés qui permettent le traitement continu et des coûts de revient raisonnables. Ils sont donc des alternatives envisageables aux procédés conventionnels de filtration et de traitement

thermique. Cependant, une partie de l'effet germicide de ces procédés repose sur l'augmentation de la température et pourrait donc s'avérer délétère à la qualité des vins et moûts traités. Parmi les procédés de stabilisation microbiologique innovants, les procédés dit « athermiques » présentent un intérêt particulier pour le traitement des vins. Les procédés de traitement par UV-C et lumière pulsée s'inscrivent dans cette catégorie et seront présentés dans la suite du document.

V. Les procédés athermiques innovants : Le rayonnement UV-C

V.1. Principe général des UV-C

Le rayonnement ultraviolet ($\lambda=100 - 400$ nm) est un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde intermédiaire entre celle de la lumière visible et celle des rayons X (Figure 3). Les rayons UV ne peuvent être observés qu'indirectement, soit par la fluorescence, soit à l'aide de détecteurs spécialisés. Le spectre ultraviolet peut être subdivisé en trois types A, B et C. Ils correspondent à trois intervalles conventionnels de longueurs d'onde. Les UV-A (400 - 315 nm), dont la longueur d'onde est relativement longue, ils représentent près de 95 % du rayonnement UV qui atteint la surface de la Terre. Les UV-B, de longueur d'onde moyenne (315 - 280 nm), représentent les 5 % restant du rayonnement UV qui atteint la surface terrestre. Enfin, les UV-C, de longueur d'onde courte (280 - 100 nm) sont les UV les plus énergétiques ainsi que les plus nocifs malgré leur faible pénétration cutanée. Ces derniers sont complètement filtrés par la couche d'ozone de l'atmosphère et n'atteignent donc théoriquement pas la surface de la Terre. La bande spectrale des UV-C peut être subdivisée en trois sous-bandes : (i) les UV-C de 280 à 230 nm, (ii) les V-UV (Vacuum ultraviolet) de 200 à 140 nm ainsi que (iii) les X-UV de 140 à 100 nm, rayonnement électromagnétique dont les longueurs d'onde sont situées entre la fin des ultraviolets et le début des rayons X.

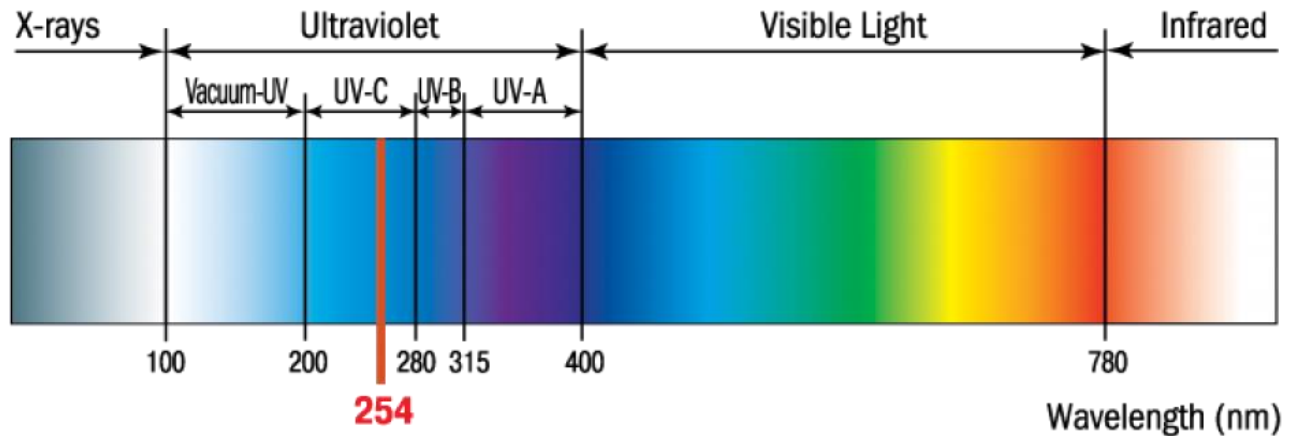


Figure 3 : Spectre électromagnétique (www.zontec.net/files/uvSpectrum.gif)

Le traitement par UV-C est intéressant car il ne requiert pas de produits chimiques et ne produit pas d'effluents. La première application de traitement des liquides à grande échelle par lumière UV a été conduite en 1906 à Marseille pour la désinfection de l'eau potable (Masschelein and Rice, 2002). De nos jours, la désinfection de l'eau par traitement UV-C est une pratique répandue. En Europe, plus de 2000 installations fournissant de l'eau potabilisée en partie par traitement UV-C (Barbosa-Canovas et al., 2004). A cause de la faible capacité de pénétration du rayonnement UV-C dans certains liquides alimentaires, le rôle de ce procédé a souvent été limité à la désinfection des surfaces, des emballages, de l'eau et de l'air (Koutchma, 2009). En effet, la condition sine qua non pour que le procédé soit efficace est l'exposition des microorganismes au rayonnement UV-C (Bintsis et al., 2000). Ainsi, les microorganismes situés loin de la source de rayonnement dans un liquide absorbant peuvent être protégés de celui-ci par l'épaisseur de liquide qui les sépare. Le développement de nouveaux réacteurs avec des paramètres hydrodynamiques optimisés permet de forcer le passage de chaque microorganisme dans une zone proche de la source de lumière ce qui augmente considérablement l'efficacité du procédé lors du traitement de liquides absorbants. Grâce à ces progrès, l'intérêt de la stabilisation microbiologique par lumière UV-C est aujourd'hui étendu à de nombreux liquides alimentaires tels que le cidre (Koutchma et al., 2004), le lait (Bandla et al., 2012), des jus de fruits variés (Baysal et al., 2013; Franz et al., 2009; Guerrero-Beltran et al., 2009; Keyser et al., 2008; Müller et al., 2013; Murakami et al., 2006), les œufs liquides (de Souza et al., 2014) mais aussi les moûts et vins au cours de la vinification (Fredericks et al., 2011 ; Junqua et al., 2021, Diesler et al., 2019 ; Golombek et al., 2021).

V.2. Les mécanismes germicides des UV-C

Le mécanisme germicide principal du rayonnement UV-C (254 nm) provient de son interaction avec l'ADN. La forte interaction des UV-C avec l'ADN est liée au spectre d'absorbance des bases puriques et pyrimidiques qui le composent (260 nm) (Sinha et al., 2002). Les bases pyrimidiques (thymine et cytosine) sont particulièrement sensibles aux UV-C. La lumière ultraviolette à ondes courtes endommage l'ADN des cellules exposées en provoquant des liaisons entre deux bases pyrimidiques adjacentes dans les chaînes d'ADN (Sinha et Häder, 2002). Cette réaction conduit à la formation de deux types de lésions (i) formation de dimères cyclobutaniques de pyrimidines (CPD) et (ii) formation de (6-4) pyrimidine-pyrimidone (6-4 PP) (Figure 4).

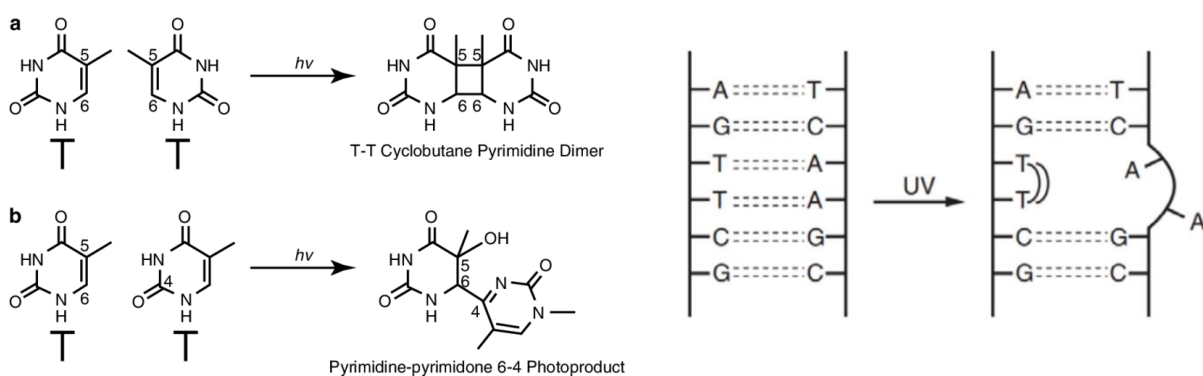


Figure 4 : Mécanismes de formation des CDP et 6-4 PP (Sinha et al., 2002)

La formation de ces deux types de liaison entre deux bases pyrimidiques adjacentes se fait au détriment des liaisons hydrogène établies entre deux bases complémentaires qui assurent la cohésion de la double hélice d'ADN. Les CPD et les 6-4 PP induisent donc une déformation de la double hélice d'ADN (coude de 7° à 9° pour les CPD et de 44° pour les 6-4 PP) (Kim et al., 1994) et bloque ainsi la progression des ARN/ADN polymérase lors de la réplication et de la transcription. Les 6-4 PP sont quantitativement les secondes lésions les plus fréquentes après une irradiation UV-B ou UV-C. Le ratio entre le nombre de CPD et le nombre de 6-4 PP formés pour une dose UVB donnée est estimé entre 8 : 1 (Perdiz et al., 2000) et 3 : 1 (Douki et al., 2001). Si elles ne sont pas réparées, une seule de ces lésions est suffisante pour inhiber complètement l'expression d'une unité transcriptionnelle. Des études ont montré que l'ARN polymérase II bloquée reste liée au site de l'obstruction. Des lésions persistantes peuvent ainsi non seulement inhiber la transcription du gène dans lequel elles se trouvent, mais aussi réduire la concentration globale d'ARN polymérase disponible. Chacune de ces lésions agit comme un bloqueur de la transcription et de la réplication. Les UV-C induisent également d'autres types de lésions sur les bases de l'ADN, comme l'hydrate de cytosine, les dimères

d'adénine ou les adduits thymine-adénine, mais la fréquence de formation de ces lésions est négligeable par rapport à la fréquence de formation des CPD et des 6-4 PP (Sinha et al., 2002). Les UV peuvent également induire des dommages sur l'ADN de façon indirecte. En effet, ils peuvent exciter des chromophores cellulaires, appelés photosensibilisateurs, comme les mélanines, les porphyrines, la riboflavine, le tryptophane, etc. (Ridley et al., 2009 ; Wondrak et al., 2006). Les photosensibilisateurs excités par l'absorption des photons UV peuvent revenir à leur état d'énergie fondamental par dissipation de chaleur ou émission de photons (phénomène de fluorescence), mais ils peuvent également subir une transition vers un état énergétique plus stable appelé état triplet. Cet intermédiaire joue un rôle clé dans l'induction des dommages indirects liés aux UV. Il peut réagir directement avec d'autres molécules, comme les bases de l'ADN, (photosensibilisation de type I) ou transférer son énergie aux molécules d'oxygène (photosensibilisation de type II), menant ainsi à la formation d'ERO comme l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) ou l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Foote, 1991) (Figure 5).

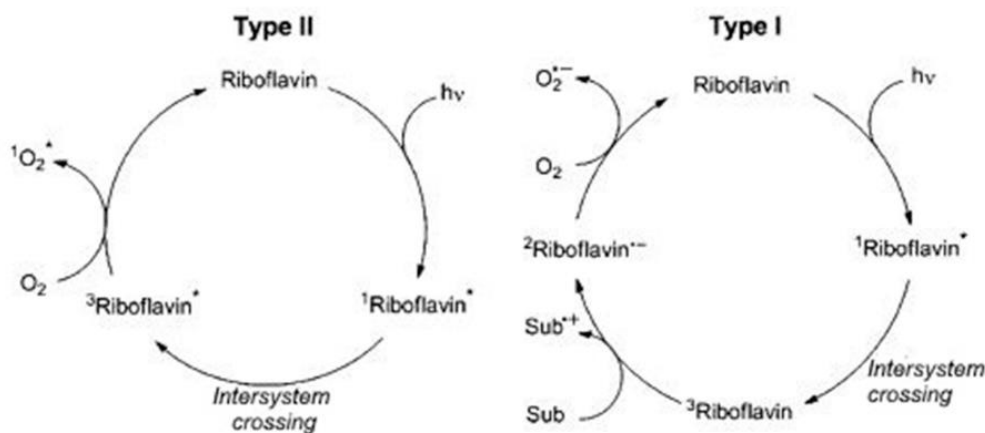


Figure 5 : Mécanisme de photosensibilisation de types I et II de la riboflavine (Cardoso et al., 2012)

L'accumulation d'ERO dans la cellule peut provoquer des lésions directes sur tous les composants cellulaires : peroxydation des lipides, oxydation des protéines et altérations des acides nucléiques. Sur l'ADN, cinq principaux types de lésions peuvent être induites par les ERO : la modification de bases, la création de sites abasiques, la formation d'adduits lipidiques, les pontages ADN-protéines et les cassures de l'hélice d'ADN (simple ou double-brin) (Cadet et al., 1999). Les bases de l'ADN sont particulièrement sensibles aux réactions d'oxydation. Parmi elles, la guanine possède le potentiel d'ionisation le plus bas et constitue donc la principale cible devant l'adénine, puis la thymine et la cytosine (Ravanat et al., 2001). L'oxydation de la guanine par une réaction de photosensibilisation de type I ou de type II

conduit à la formation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) (Wondrak et al., 2006). Contrairement aux dimères de pyrimidines qui induisent des distorsions de la structure de l'ADN, la 8-oxoG ne crée pas de déformation de l'ADN (Lipscomb et al., 1995). Il ne s'agit donc pas d'une lésion bloquante pour les polymérases répliquatives et transcriptionnelles.

Les organismes ont cependant, développé des mécanismes de réparation afin de limiter l'impact potentiellement létal de ces lésions de l'ADN. Des protéines de réparation spécialisées scannent le génome en continu pour détecter la présence de lésions de l'ADN. Quand une protéine de reconnaissance de lésion rencontre (i) un appariement incompatible entre deux bases (ii) un site apurinique ou apyrimidique ou bien (iii) des bases structurellement modifiées, elle déclenche différents mécanismes de réparation de l'ADN, qui permettent la restauration de l'information génétique. Deux mécanismes principaux coexistent, la photoréactivation et le « dark-repair ». La photoréactivation est le mécanisme principal de réparation des lésions de l'ADN induites par l'exposition au rayonnement UV. Ce mécanisme est relativement simple et fait appel à l'action d'enzymes appelées photolyases. Ces enzymes ont la capacité de se lier spécifiquement aux CPD (photolyase CPD) et au 6-4 PP (6-4 photolyase) et d'en défaire la liaison entre les deux bases pyrimidiques (Figure 6). Comme son nom l'indique, la photoréactivation est dépendante de l'énergie lumineuse.

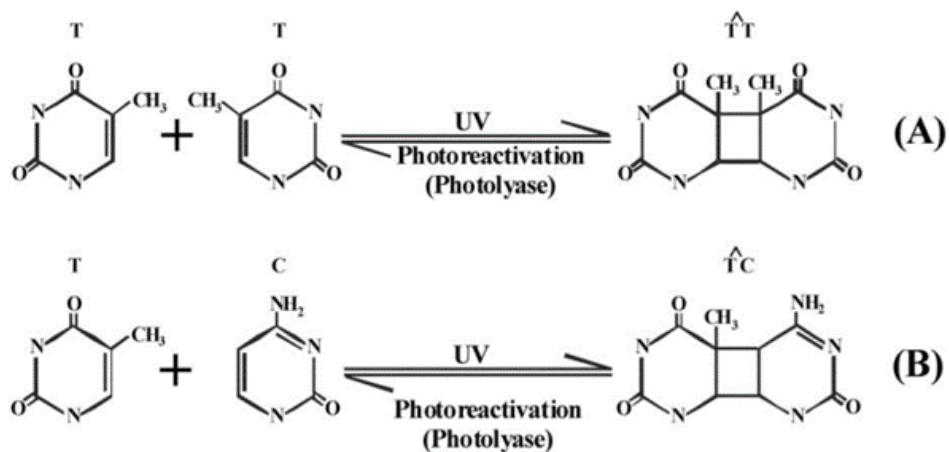


Figure 6 : Mécanisme de photoréactivation (Sinha et al., 2002)

Le « dark-repair » fait quant à lui référence aux mécanismes de réparation de l'ADN par excision et comme son nom l'indique il ne requiert pas d'énergie lumineuse. Dans ces mécanismes, la lésion n'est pas directement inversée, mais éliminée par excision puis remplacée par des nucléotides inaltérés. Il existe deux mécanismes de réparation par excision,

la réparation par excision de base (Base Excision Repair; BER) et la réparation par excision de nucléotides (Nucleotide Excision Repair; NER (Sinha et al., 2002).

D'autres mécanismes de réparation des lésions de l'ADN existent tels que le MisMatch Repair (MMR), la recombinaison et la jonction d'extrémités non homologues (Non-Homologous End-Joining; NHEJ). La présence ou l'absence de ces différents mécanismes de réparation ainsi que leurs niveaux d'expression relatifs varient en fonction des espèces et des souches de microorganismes. Une petite fraction de ces lésions (CPD, 6-4 PP et autres) peut entraîner l'apparition de mutations suite à des réparations défectueuses de l'ADN (Sinha et al., 2002). En effet, les dimères de pyrimidines induits par les UV sur l'ADN entraînent une distorsion de la double hélice d'ADN qui bloque notamment la progression des polymérase répliquatives. Si la lésion n'est pas réparée, le passage de certaines polymérase (polymérase « translésionnelle ») sur cette lésion peut provoquer l'insertion d'une base incorrecte en face des bases lésées (Figure 7). Ce mécanisme induit des mutations dans les cellules exposées et est responsable des propriétés mutagènes et cancérigènes du rayonnement UV.

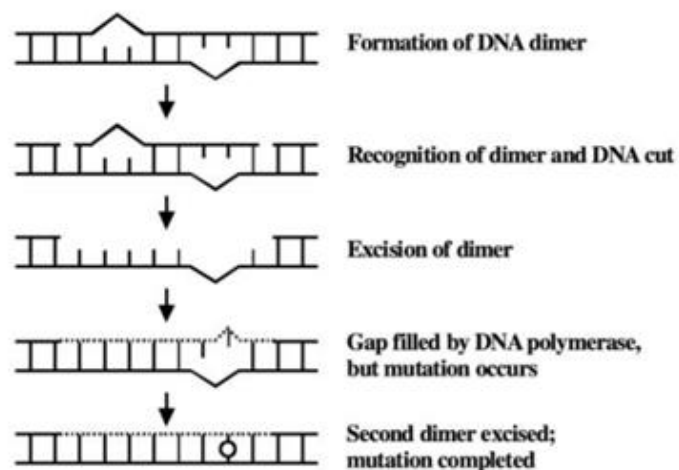


Figure 7 : Mécanisme d'apparition des mutations (Sinha et al., 2002)

Par conséquent, les phénomènes de photo-oxydation ainsi que les lésions de l'ADN (si elles ne sont pas réparées), peuvent interférer avec la transcription et la répliquaison de l'ADN, conduire à une mauvaise lecture du code génétique, provoquer des mutations et conduire à la mort de la cellule ou du microorganisme irradié.

V.2.1.1. Sources de rayonnement UV-C

- Les Lampes à mercure

Les lampes à vapeur de mercure basse et moyenne pression (Low Pressure Mercury Lamp – LPM ; Medium Pressure Mercury lamp – MPM) sont utilisées depuis une cinquantaine d'années dans des applications de désinfection variées. Le fonctionnement de ces lampes est bien caractérisé, de plus elles présentent l'avantage d'être fiables, peu onéreuses et dotées généralement d'une durée de vie importante (> 24 000 heures). Ces lampes sont constituées d'un tube en quartz scellé aux deux extrémités qui contient de vapeur de mercure et d'argon. Le tube en quartz présente une électrode à chacune de ses extrémités. L'ionisation des atomes de mercure par les décharges électriques entre deux électrodes engendre une émission de photons lors du retour de ces atomes dans leur état fondamental. Les LPM et MPM diffèrent de par la pression du gaz dans l'ampoule pendant le fonctionnement de la lampe, la température de fonctionnement et enfin le spectre d'émission lumineuse.

Les MPM opèrent à une pression de 10^6 à 10^7 Pa. La puissance utile est de l'ordre de 5 à 30 W.cm^{-2} . Ces lampes sont polychromatiques et émettent sur une large plage de 200 à 600 nm (Figure 8 B) (Koutchma, 2009). Elles sont préférées pour le traitement des eaux ou les applications de photo-dégradation et ne sont pas considérées comme des choix pertinents pour la désinfection des liquides alimentaires malgré leur puissance et donc leur potentiel de pénétration élevé même dans les liquides absorbants. En effet, le spectre d'émission polychromatique inclut des longueurs d'onde (UV-B ; UV-A ; lumière visible) susceptibles d'induire une dégradation importante du produit traité, de plus leur température de fonctionnement comprise entre $400 \text{ }^\circ\text{C}$ et $800 \text{ }^\circ\text{C}$ oblige un système de refroidissement supplémentaire (Junqua, 2017). Les LPM opèrent à une pression comprise entre 10^2 et 10^3 Pa et leur puissance utile est de l'ordre de 0.2 à 0.3 W.cm^{-2} . Contrairement aux MPM, le spectre d'émission des LPM est essentiellement concentré sur la raie à 253.7 nm (Figure 8 A), mais aussi aux alentours de 185 nm (Koutchma, 2009). Cette raie d'émission secondaire est génératrice d'ozone et peut entraîner des phénomènes d'oxydation importants dans le produit, cependant, l'utilisation de dioxyde de titane dans la conception du verre de l'ampoule permet de bloquer cette dernière et d'assurer ainsi un rayonnement essentiellement monochromatique (Voronov et al., 2007). La température de fonctionnement des LPM est relativement faible (de l'ordre de $50 \text{ }^\circ\text{C}$) (Koutchma, 2009). De plus, depuis quelques années

des lampes basse pression à amalgame de mercure sont disponibles sur le marché. Ces lampes (LPMHO pour « Low Pressure Mercury Lamp High Output ») contiennent un amalgame de mercure qui leur confère une puissance utile de 1 à 5 W.cm⁻² donc 5 à 10 fois plus puissantes que des LPM classiques. En contrepartie ces lampes possèdent une durée de vie plus limitée, (proche des 10 000 heures) et opèrent à une température proche des 100 °C (Koutchma, 2009). Les LPM et LPMHO, de par la spécificité de leur spectre d'émission à 253.7 nm et leurs températures de fonctionnement modérées, sont le meilleur compromis parmi les lampes à mercure entre efficacité de stabilisation microbiologique et risque des modifications organoleptiques des produits traités.

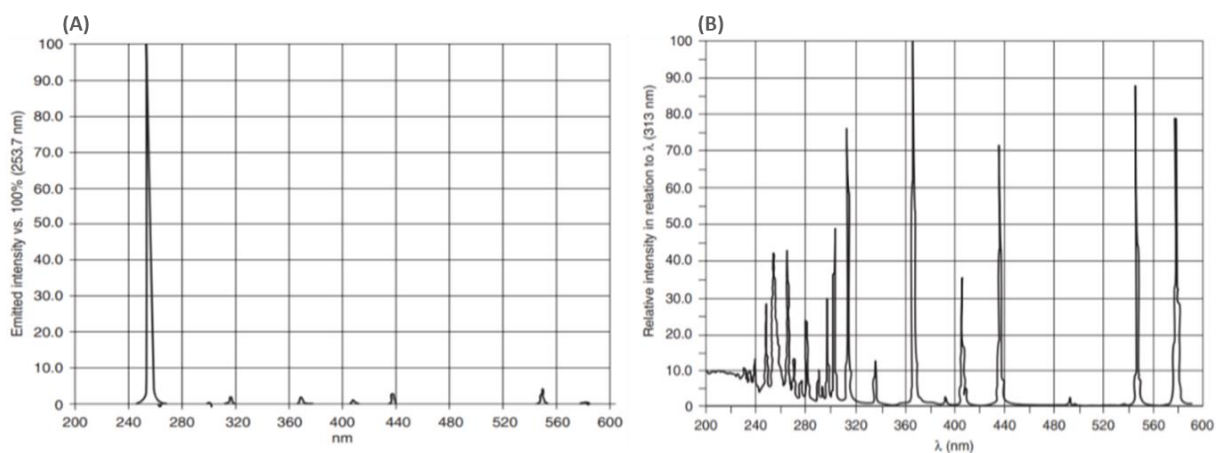


Figure 8 : Spectre d'émission d'une LPM (A) et d'une MPM (B) (Koutchma, 2009).

- Sources alternatives de rayonnement UV-C

En dehors des lampes à pression de mercure très largement répandues, d'autres sources de rayonnement UV-C ont été développées. Parmi elles on retrouve les lampes de type excimère, les lampes à micro-ondes, la lumière UV pulsée et enfin les diodes électroluminescentes (LED) UV-C.

Les lampes à micro-ondes sont des LPM classiques qui sont alimentées par micro-ondes. Cette nouvelle technologie permet de s'affranchir des électrodes car les atomes d'argon et de mercure sont excités via des micro-ondes dirigées au travers des lampes. Les lampes produisent un rayonnement similaire à celui des LPM classiques et opèrent aux mêmes températures. Cependant, l'utilisation des micro-ondes à la place des électrodes diminue les temps de préchauffage des lampes et augmente considérablement leur temps de vie (Meier et al. 2007).

Les lampes de type excimère, pour « dimères excités », sont basées sur l'émission de photon par le retour à l'état fondamental d'un dimère excité de gaz rare (Gr_2^*), d'halogènes (X_2^*) ou bien d'un complexe excité formé entre un gaz rare et un halogène ($Gr-X^*$). La longueur d'onde du photon produit dépend des gaz choisis et est quasiment monochromatique. Les lampes excimères présentent un large éventail de rayonnement monochromatiques entre 100 et 350 nm. Il est possible d'exciter simultanément différents types de molécules excimères afin de procéder à une irradiation polychromatique précise. Ces lampes n'émettent aucun rayonnement dans le domaine de la lumière visible et de l'infrarouge, ne chauffent que faiblement, peuvent fonctionner sans être préchauffées et enfin, elles ne contiennent pas de mercure (Koutchma, 2009).

Les LED sont des dispositifs semi-conducteurs capables de générer des rayonnements de longueurs d'onde variés. Les propriétés de ce rayonnement dépendent de la composition des diodes utilisées et du courant qui les alimente. Les LED permettent de générer un grand nombre de rayonnements de longueurs d'onde spécifiques allant des infrarouges jusqu'aux UV-C. Elles connaissent actuellement un développement important et pourraient dans les années à venir remplacer les lampes à mercure dans un nombre important d'applications. Les LED sont considérées comme « respectueuses de l'environnement », moins dangereuses pour le manipulateur (absence de mercure), peu coûteuses et à faible consommation électrique. En ce qui concerne leur fonctionnement, les LED présentent différents avantages, elles ne génèrent aucune chaleur, leur efficacité n'est pas impactée par la température ambiante et elles ne nécessitent pas de préchauffage. De plus, en raison de leur rayonnement quasiment monochromatique, il est possible d'irradier à une longueur très spécifique ou bien d'utiliser simultanément différents types de LED afin de combiner les effets germicides de différentes longueurs d'ondes choisies (Chen et al., 2017).

V.3. Les interactions avec la matière

Le rayonnement UV-C en se propageant interagit avec la matière qu'il rencontre au travers des phénomènes physiques suivant (Figure 9) : (i) absorption (ii) réflexion (iii) diffusion (iv) réfraction et (iv) diffraction. Ainsi le rayonnement UV-C dans un réacteur va interagir avec chaque composant du réacteur qu'il rencontre entre son point d'émission au cœur de la lampe UV et le microorganisme cible. La nature des interactions et leur impact sur la propagation du rayonnement sont dépendants des propriétés physico-chimiques et géométriques de la

matière irradiée. Chacune de ces interactions avec la matière modifie l'intensité du rayonnement qui parvient jusqu'au microorganisme.

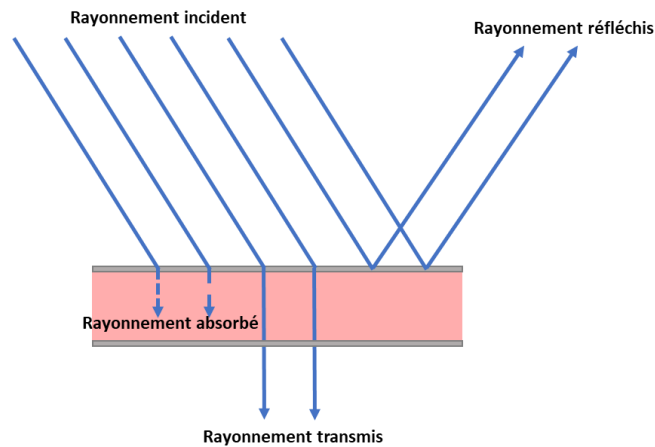


Figure 9 : Représentation schématique de la transmission du rayonnement UV-C

L'absorption du rayonnement est définie comme la conversion de l'énergie des photons en d'autres formes d'énergie (calorifique, chimique ou cinétique) en traversant une substance ou un matériau. La loi de Beer-Lambert (équation 1), établit une relation linéaire entre l'absorbance (A), la concentration d'un composé absorbant (c , en mol.L^{-1}), le coefficient d'extinction molaire de ce composé (ϵ , en $\text{l. mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et le trajet optique (d , en cm).

$$A = c \times \epsilon \times d \quad \text{Équation 1}$$

Pour caractériser l'absorbance d'un liquide, d'un matériau ou bien même d'un réacteur, plusieurs paramètres peuvent être utilisés. Le coefficient d'absorbance α (en cm^{-1}) permet de caractériser le liquide traversé, il est défini par le rapport de l'absorbance (A) sur la longueur du trajet optique (d , en cm) (équation 2). Il est spécifique à un liquide et à une longueur d'onde donnée.

$$\alpha = A/d \quad \text{Équation 2}$$

La profondeur de pénétration (λ , en cm) correspond à l'épaisseur de liquide pour laquelle un pourcentage défini du rayonnement a été absorbé (équation 3). Il est spécifique du liquide et d'une longueur d'onde donnée.

$$\lambda = 1/\alpha \quad \text{Équation 3}$$

La transmittance (T , en %) correspond au rapport entre l'intensité du rayonnement transmis (I) par rapport à l'intensité de l'énergie incidente (I_0) (équation 4). La transmittance est spécifique d'un liquide, d'une épaisseur donnée et d'une longueur d'onde donnée.

$$T = I/I_0 \quad \text{Équation 4}$$

Des exemples de coefficient d'absorbance, profondeur de pénétration et de transmittance pour différents liquides alimentaires sont donnés dans le tableau ci-dessous (Tableau 3)

Substance	Absorption coefficient, cm^{-1}	Transmittance, 1 cm, %	Transmittance, 0.1 cm, %	Penetration for 90% absorption, cm
Water	0.01	97.72	99.77	100
Waste water	14	~0	3.98	0.07
Clear apple juice	15	~0	3.16	0.067
Apple cider	40	~0	0.01	0.025
Orange juice	100	~0	0.00	0.010
Liquid sucrose	4.5	0.0032	35.48	0.022
Beer	16	~0	2.51	0.063
Coca-cola, bottled	31	~0	0.08	0.032
Milk, raw	290	~0	0.00	0.003
Egg white	104	~0	~0	0.001
Wine, sherry	9	~0	12.59	0.111

Tableau 3 : Coefficients d'absorbance à 254nm, transmittances et profondeurs de pénétration de liquides alimentaires variés (Koutchma T., 2009).

L'absorption du rayonnement le rend indisponible pour l'inactivation des microorganismes contrairement aux phénomènes de diffusion, de réflexion, de réfraction et de diffraction qui ne font que modifier la trajectoire du rayonnement sans en atténuer l'énergie. La diffusion correspond à la modification de trajectoire du rayonnement lorsque celui-ci interagit avec une particule dont la dimension est inférieure à la longueur d'onde du rayonnement. La diffraction peut être vue comme la diffusion de l'onde électromagnétique lorsqu'elle rencontre une ouverture ou un obstacle dont la dimension est proche de celle de la longueur d'onde du rayonnement. La réfraction est le phénomène de changement de direction du trajet lumineux lorsqu'il passe d'une matière à une autre, comme par exemple de l'air à l'eau. La réflexion est le phénomène de changement de direction du rayonnement sur une surface. Le rayonnement réfléchi n'est ni transmis, ni absorbé, mais sa trajectoire est déviée selon un angle dépendant de son angle d'incidence. Cette portion du rayonnement n'est cependant, pas forcément perdue et peut être redirigée vers le produit ou la surface à traiter par l'utilisation de réflecteurs. Parmi ces différents phénomènes d'interaction entre le rayonnement et la matière, l'absorbance est le plus impactant sur l'efficacité du procédé. Plus l'absorbance est élevée moins le rayonnement pénètre le liquide ce qui diminue naturellement la probabilité qu'un microorganisme soit exposé au rayonnement UV-C. Muller et al., en 2015 ont mesuré dans un réacteur hélicoïdal, les doses UV-C requises pour l'inactivation d'*E. coli* dans des solutions présentant des coefficients d'absorbance croissants (0, 10, 20, 30, 40, 60 cm^{-1}). Ils ont démontré que pour des solutions de coefficients d'absorbance compris entre 0 et 40 cm^{-1} il existe une relation linéaire entre la dose requise et l'absorbance du liquide. La dose requise

pour l'inactivation augmente avec l'augmentation du coefficient d'absorbance. Cependant, pour des valeurs de coefficient d'absorbance supérieures à 40 cm^{-1} , la dose requise n'augmente plus (Figure 10).

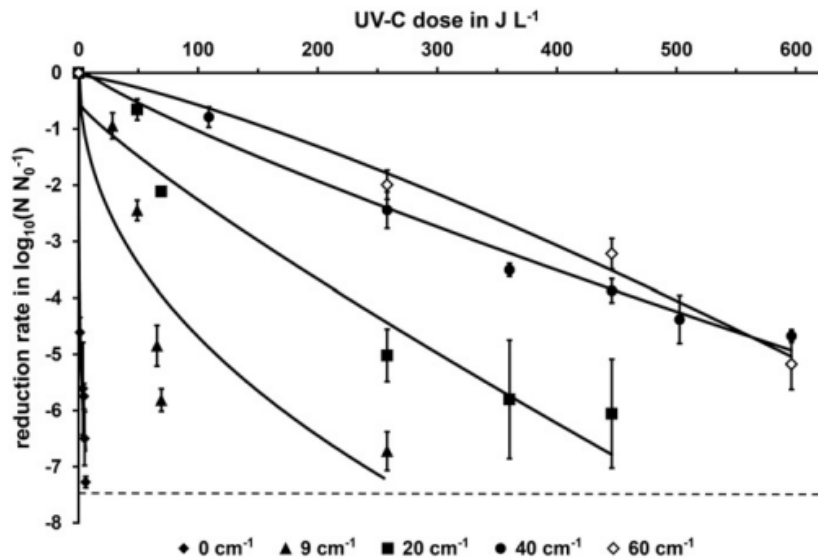


Figure 10 : Effet du coefficient d'absorbance sur la cinétique d'inactivation d'E. coli en solution modèle (Müller et al., 2015).

Il est possible d'expliquer ce comportement par la relation qui lie la profondeur de pénétration au coefficient d'absorbance ($\lambda=1/\alpha$) plus ce coefficient est élevé, moins la profondeur de pénétration varie (Figure 11).

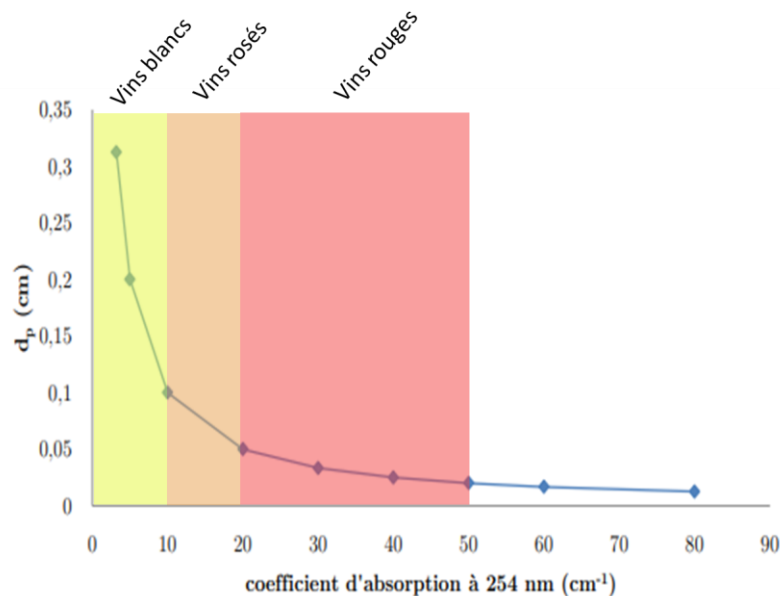


Figure 11 : Représentation graphique de la variation de profondeur de pénétration (d_p) en fonction du coefficient d'absorption à 254nm (Junqua, 2017).

Entre 0 cm^{-1} et 20 cm^{-1} , l'augmentation du coefficient d'absorbance diminue drastiquement la profondeur de pénétration du rayonnement. Entre 20 et 40 cm^{-1} l'augmentation du

coefficient induit une diminution plus modérée de la profondeur de pénétration. Enfin au-delà de 40cm^{-1} , une augmentation de ce coefficient ne se traduit alors plus par une diminution significative de la profondeur de pénétration du rayonnement et donc des performances du réacteur. (Junqua, 2017).

Enfin, Müller et al., en 2015 ont également étudié l'impact de la turbidité l'efficacité du traitement UV-C (Figure 12). La cinétique d'inactivation d'*E. coli* dans une solution dont le coefficient d'absorbance est de 9cm^{-1} et la turbidité de 0 NTU n'est pas significativement différente à celle obtenue pour une solution de coefficient d'absorbance équivalent (9cm^{-1}), mais de turbidité égale à 10 000 NTU. Ces résultats démontrent un impact beaucoup plus faible de la turbidité sur la dose requise pour l'inactivation d'*E. coli*. L'interaction du rayonnement avec les particules (non absorbantes) en suspension dans la solution n'implique pas de phénomène d'absorption du rayonnement, mais uniquement une modification de sa trajectoire (diffusion). Le rayonnement reste donc disponible pour l'inactivation ce qui explique l'effet moins important de la turbidité sur l'efficacité du traitement.

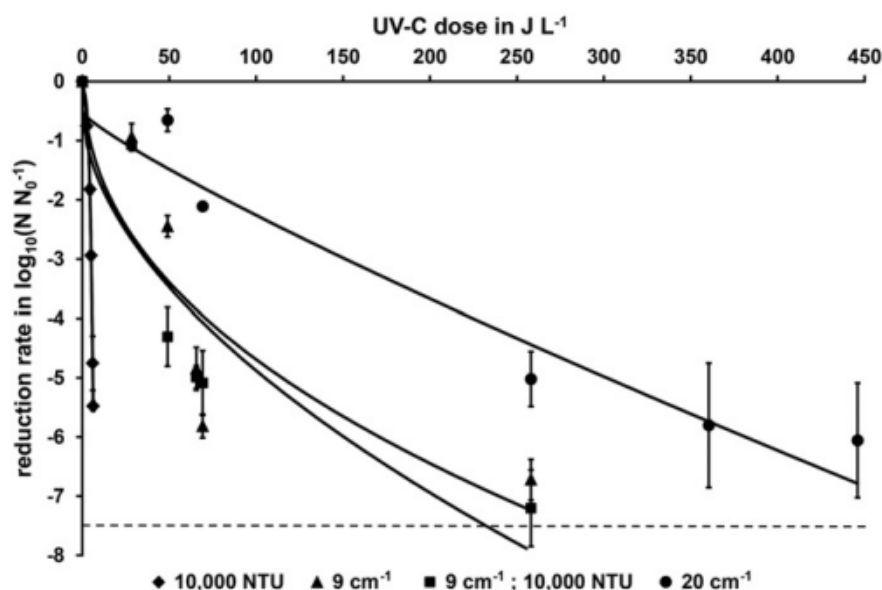


Figure 12 : Effet de la turbidité sur la cinétique d'inactivation d'*E. coli* en solution modèle (Müller et al., 2015).

V.4. Les réacteurs UV-C continus

La faible pénétration du rayonnement est la principale limite à l'utilisation des UV-C pour la stabilisation microbiologique de liquides absorbants tels que le vin. Le design du réacteur et les caractéristiques d'écoulement du liquide jouent un rôle déterminant sur l'efficacité du traitement. Dans un système non optimisé, la répartition des temps de séjour de différentes

portions du volume d'un liquide n'est pas répartie de manière uniforme. Il en résulte alors une distribution hétérogène du rayonnement UV-C avec une surexposition d'une partie du liquide et une sous exposition au rayonnement du reste du volume. (Gayan et al., 2014). La conception d'un système efficace doit compenser la profondeur de pénétration relativement faible des photons ultraviolets tout en assurant une distribution uniforme du rayonnement UV-C (Gayan et al., 2014). Un tel système peut permettre une diminution des doses requises pour l'inactivation de microorganismes et par la même occasion la diminution des risques d'altération du produit. Un certain nombre de ces réacteurs continus ont été développés et validés pour le traitement de liquides alimentaires variés.

Deux stratégies existent pour la conception de réacteur UV-C destinés au traitement de liquide absorbants. La première approche est basée sur l'exposition d'une couche mince de liquide pour diminuer la longueur du trajet UV afin d'atteindre les micro-organismes sur l'ensemble de l'épaisseur du fluide. La seconde approche quant à elle, est basée sur l'amélioration des conditions de mélange au cours du traitement en favorisant l'apparition de tourbillons ou la génération de turbulences (Franz et al., 2009 ; Koutchma et al., 2007).

Les réacteurs annulaires sont les plus couramment utilisés. Ces réacteurs de types « couche mince » sont constitués de deux tubes concentriques, entre lesquels le liquide s'écoule. Le tube interne étant généralement une gaine en quartz dans laquelle est insérée la lampe et le tube externe un carter métallique (Figure 13 A). L'espacement entre les deux tubes varie en fonction des contraintes de débit de traitement et d'absorbance du liquide. Pour le traitement des liquides les plus absorbants il existe des réacteurs capables de former de fines épaisseurs de liquide (< 1 mm) afin de favoriser la pénétration des rayons UV-C. Des versions optimisées de ce type de réacteurs ont été mises au point dans le but d'améliorer l'efficacité du traitement des liquides les plus fortement absorbants. Dans ces systèmes, la génération de turbulence ou de vortex est favorisée afin de d'augmenter le mélange du liquide au sein de la couche mince. Cette modification des conditions d'écoulement est obtenue soit par : (i) l'utilisation d'une paroi externe ondulée ou spiralée qui combinée à un débit élevé de traitement crée des turbulences importantes (Figure 13 B). ; soit par la génération d'instabilité de Taylor-couette (tourbillons) par rotation de l'un des tubes concentriques (Forney et al., 2004) (Figure 13 C).

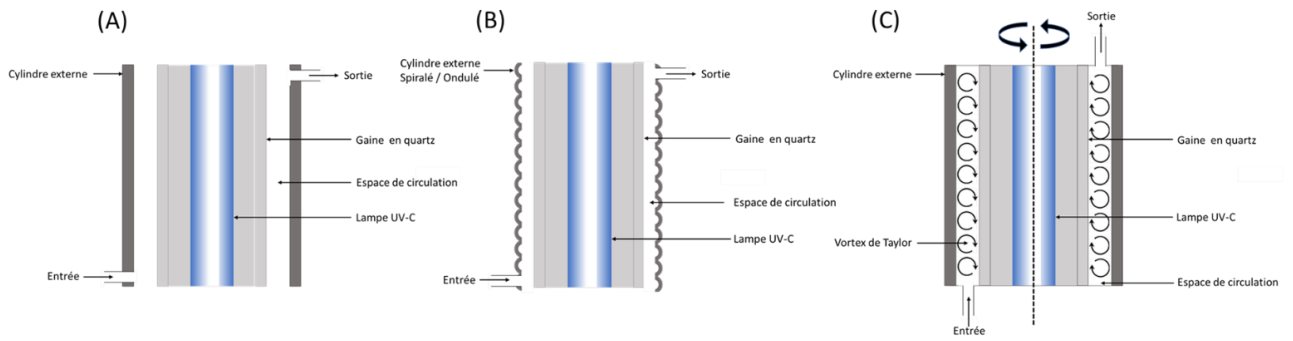


Figure 13 : Représentation des différents types de réacteurs annulaires (A)

Le second type de réacteur UV-C est basée sur l'utilisation de tubes enroulés autour de la gaine en quartz qui contient la lampe UV-C. Ces réacteurs sont dits « hélicoïdaux » et sont basés principalement sur la génération de vortex de Dean (Figure 14). Ces écoulements secondaires aussi appelés instabilité de Dean apparaissent sous l'effet de la force centrifuge résultant du rayon de courbure de la conduite (Dean et al., 1927). La génération de vortex de Dean augmente significativement les taux de mélange au sein du fluide (Moll et al., 2007 ; Moulin et al., 1999).

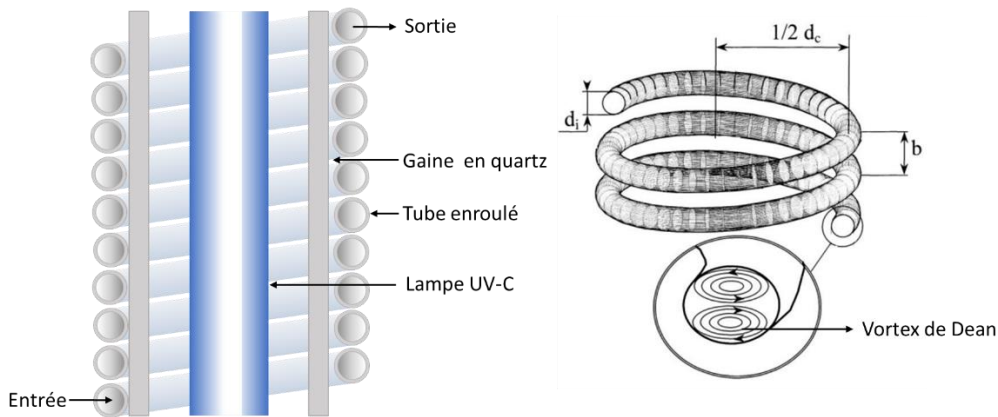


Figure 14 : Représentation d'un réacteur hélicoïdale

Afin de caractériser ces écoulements secondaires, il est nécessaire de définir le nombre de Reynolds (Re) qui exprime le rapport entre les forces d'inertie et visqueuses par la relation suivante (équation 5) :

$$Re = \frac{\rho V D}{\mu} \quad \text{Équation 5}$$

Où ρ est la masse volumique du fluide en kg.m^{-3} , V la vitesse axiale en m.s^{-1} , D le diamètre interne du tube (en m) et μ la viscosité dynamique (Pa.s ou $\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$). En fonction des nombres de Reynolds croissants, on distingue quatre régimes d'écoulement principaux : régime de Stokes, régime laminaire, régime transitoire et régime turbulent. Le nombre de

Dean (De) quant à lui caractérise l'intensité des flux secondaires que sont les vortex de Dean au sein d'une conduite hélicoïdale. Il est dépendant du régime d'écoulement principale caractérisé par le nombre de Reynolds (Re, équation 5) ainsi que des propriétés géométriques de l'enroulement (d_i : diamètre interne du tube ; d_c : diamètre de l'hélice). Le nombre de Dean est défini de la façon suivante (équation 6) :

$$De = Re \sqrt{\frac{d_i}{d_c}} \quad \text{Équation 6}$$

Avec Re le nombre de Reynolds, d_i le diamètre interne du tube (en m) et d_c le diamètre de l'enroulement. L'augmentation du nombre de Dean se traduit physiquement par une augmentation de la vitesse radiale du liquide dans la conduite et donc une amélioration de l'homogénéité du traitement suite au passage répété du liquide au contact du rayonnement. La génération des vortex est fortement favorisée lorsque le ratio d_i/d_c est compris entre 0.03 et 0.1 (Koutchma et al., 2007 ; Choudhary et al., 2011). De plus, l'écoulement de Dean se produit dans le régime turbulent ($Re > 2000$) lorsque le nombre de Dean est supérieur à 400 (Ligrani et al., 1994). Avec l'augmentation du débit, les turbulences dominent le modèle d'écoulement (Müller et al., 2011 et 2014). Différentes études ont démontré une meilleure efficacité du traitement UV-C dans un réacteur hélicoïdal par rapport aux réacteurs annulaires (Junqua, 2017). Les auteurs attribuent ces performances à un traitement plus uniforme lié aux meilleures conditions de mélange. Une étude récente de Mandal et al., (2021) a confirmé par modélisation numérique (mécanique des fluides computationnelle) une plus grande efficacité des réacteurs hélicoïdaux par rapport aux réacteur annulaires. Enfin, contrairement aux réacteurs à couches minces, les possibilités de changement d'échelle sont moins dépendantes de l'épaisseur du liquide dans le cas d'un traitement turbulent. Par conséquent, des capacités de traitement plus élevées pour la stérilisation des aliments liquides sont possibles en utilisant des tubes enroulés. Pour ces différentes raisons, à l'heure actuelle les réacteurs hélicoïdaux semblent être les plus adaptés au traitement des liquides les plus absorbants.

V.5. Application des UV-C en œnologie

V.5.1. La stabilisation microbiologique par UV-C

Depuis maintenant une dizaine d'année, les études portant sur l'utilisation des UV-C à différentes étapes de la vinification se multiplient. Une grande partie des résultats issus de ces

travaux révèlent le haut potentiel du rayonnement UV-C au cours de la vinification. Concernant l'efficacité de la stabilisation microbiologique des moûts et des vins, ces travaux semblent se rejoindre sur certains points. Premièrement, toutes les études que l'on trouve sur le sujet pointent du doigt l'impact de l'absorbance sur l'efficacité du traitement et donc une plus grande difficulté à stabiliser microbiologiquement les moûts et vins rouges par rapport aux moûts et vins blancs. Les polyphénols sont en partie responsables de cette différence et notamment les anthocyanes connues pour leur grande absorbance dans l'UV. Junqua et al., en 2020 ont obtenu une inactivation complète de 10^6 UFC.mL⁻¹ de *S. cerevisiae* dans un vin blanc et un vin rosé avec une dose UV-C de 570 J.L⁻¹ à l'aide d'un réacteur hélicoïdal. Ces deux vins présentaient des coefficients d'absorbance respectifs de 5 et 8 cm⁻¹. Pour obtenir un résultat similaire, cette fois-ci dans un vin rouge dont le coefficient d'absorbance était de 47 cm⁻¹ une dose UV-C de 5100 J.L⁻¹ a été nécessaire (Figure 15).

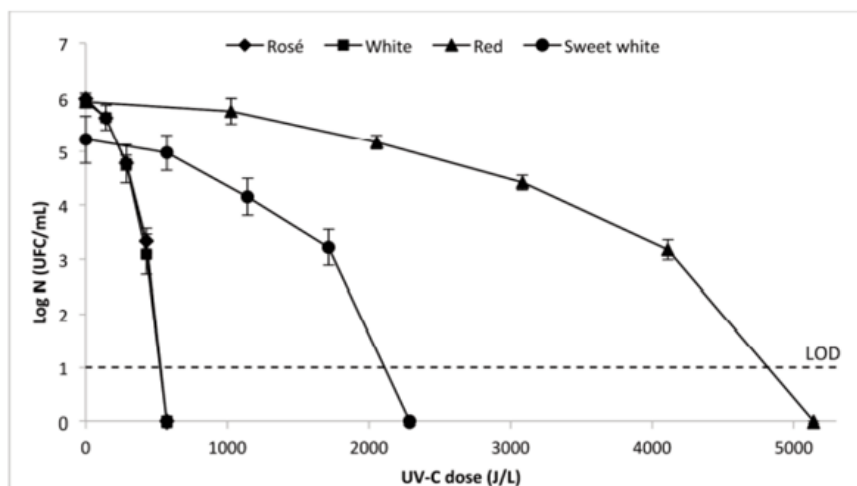


Figure 15 : Cinétiques d'inactivation de *S. cerevisiae* dans différents vins (Junqua, 2017)

De la même manière, Diesler et al., (2019) ont étudié les cinétiques d'inactivation de *S. cerevisiae* inoculée 10^6 UFC.mL⁻¹ dans des moûts de Müller-Thurgau, Pinot noir et de Riesling (Figure 16). Une dose de 600 J.L⁻¹ a permis l'inactivation complète des levures dans le moût de Riesling ($DO_{254} = 9.6 \pm 0.3$ et 36.0 ± 0.2 NTU). L'inactivation de *S. cerevisiae* dans le moût de Müller-Thurgau a quant à elle nécessité une dose de 800 J.L⁻¹. Ce moût présentait une absorbance équivalente ($DO_{254} = 9.4 \pm 0.4$), mais une turbidité plus élevée (26.7 ± 3.8 NTU), ce qui démontre un impact non négligeable de la turbidité sur l'efficacité du procédé (dose UV-C 25 % plus importante pour le moût le plus turbide). Enfin, l'inactivation complète n'a pas pu être obtenue dans le moût de Pinot noir ($DO_{254} = 21.5 \pm 1.4$ et 144.5 ± 16.1 NTU) même avec une dose UV-C de 1200 J.L⁻¹.

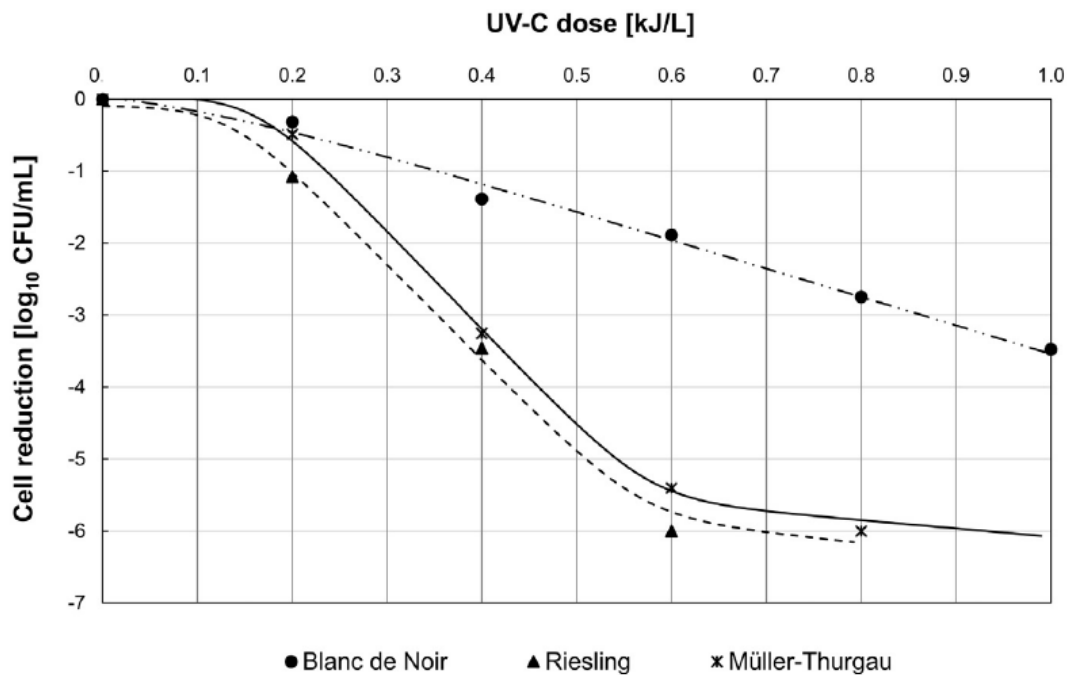


Figure 16 : Cinétiques d'inactivation de *S. cerevisiae* dans différents moûts (Diesler et al., 2019)

Les études portant sur la stabilisation microbiologique des moûts et des vins font souvent état d'une diversité importante au sein des différents microorganismes vis-à-vis de leur résistance au traitement UV-C. D'une manière générale, il y a un consensus sur le fait que les bactéries sont plus sensibles au rayonnement UV-C que les levures. La composition de leur génome est plus riche en thymine que celui des levures, ce qui induirait une probabilité plus importante de formation de dimères de pyrimidines suite à l'exposition au rayonnement. Cette diversité entraîne des différences importantes entre les doses UV-C nécessaires pour la stabilisation de différents microorganismes dans une même matrice. Junqua et al., en 2020, ont étudié les courbes d'inactivation suite au traitement UV-C d'un vin blanc ($\alpha_{254} = 5 \text{ cm}^{-1}$; < 1 NTU) inoculé avec différents microorganismes (Figure 17). Dans cette étude une souche de *S. cerevisiae* (FX10), deux souches de *B. bruxellensis* (CBS2499 et AWRI1608) ainsi qu'une souche d'*A. aceti* (08ba01) ont été utilisées. Les auteurs ont montré des écarts importants entre les doses requises pour l'obtention d'une inactivation complète de différents microorganismes. L'inactivation de la population bactérienne a été réalisée grâce à une dose de 200 J.L^{-1} tandis que les doses requises pour l'inactivation des levures *B. bruxellensis* et *S. cerevisiae* étaient respectivement de 400 et 600 J.L^{-1} , soit 2 à trois fois plus importantes que pour *A. aceti*. Ces résultats indiquent une sensibilité plus importante chez *B. bruxellensis* que chez *S. cerevisiae*.

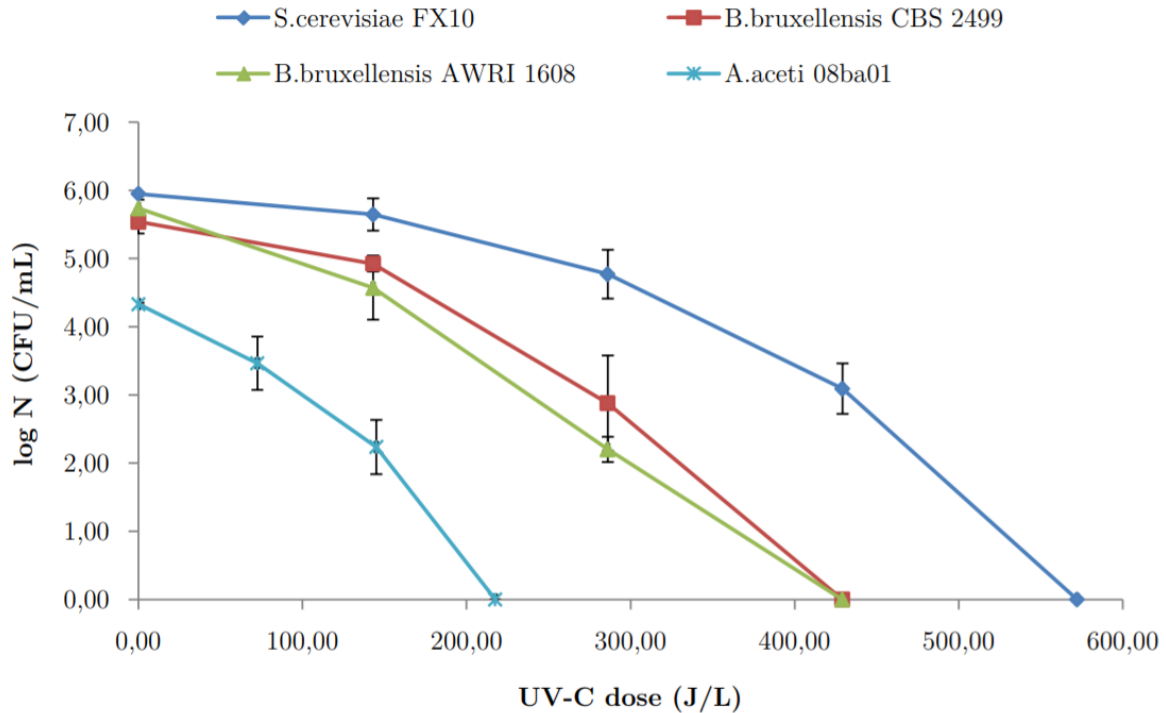


Figure 17 : Cinétiques d'inactivation de *S. cerevisiae* (FX10), *B. bruxellensis* (AWRI1608 et CBS2499) et *A. aceti* (08ba01) dans un vin blanc (Junqua et al., 2020)

Diesler et al., en 2019 ont quant à eux comparé les cinétiques d'inactivation de 6 espèces de levure d'espèces différentes (Figure 18). Des souches de *S. cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia fermentans*, *Candida spp.*, *Schizosaccharomyces pombe* et *Metschnikowia pulcherrima* ont été inoculées (10^6 UFC.mL⁻¹) séparément dans du moût stérilisé de Muller-Thurgau. Différentes tolérances au rayonnement UV-C ont été observées parmi les six espèces de levures étudiées. *M. pulcherrima* et *Schizosaccharomyces pombe* ont montré la résistance aux UV-C la plus élevée, en effet, l'obtention de l'inactivation complète (réduction de 6 log de ces espèces a nécessité une dose de 1200 J.L⁻¹. Parmi les six espèces étudiées, *S. cerevisiae*, *Candida spp.* et *H. uvarum* ont exprimé la sensibilité la plus importante au traitement UV-C. Pour ces trois espèces, l'application d'une dose UV-C comprise entre 600 et 800 J.L⁻¹ a permis une inactivation complète dans le moût (réduction de 6 log). Enfin, *P. fermentans* a exprimé une sensibilité intermédiaire au traitement avec une dose UV-C de 1000 J.L⁻¹ nécessaire à son inactivation dans le moût. Cette disparité pourrait être due à des mécanismes différents de réparation et de protection de l'ADN parmi les différentes levures.

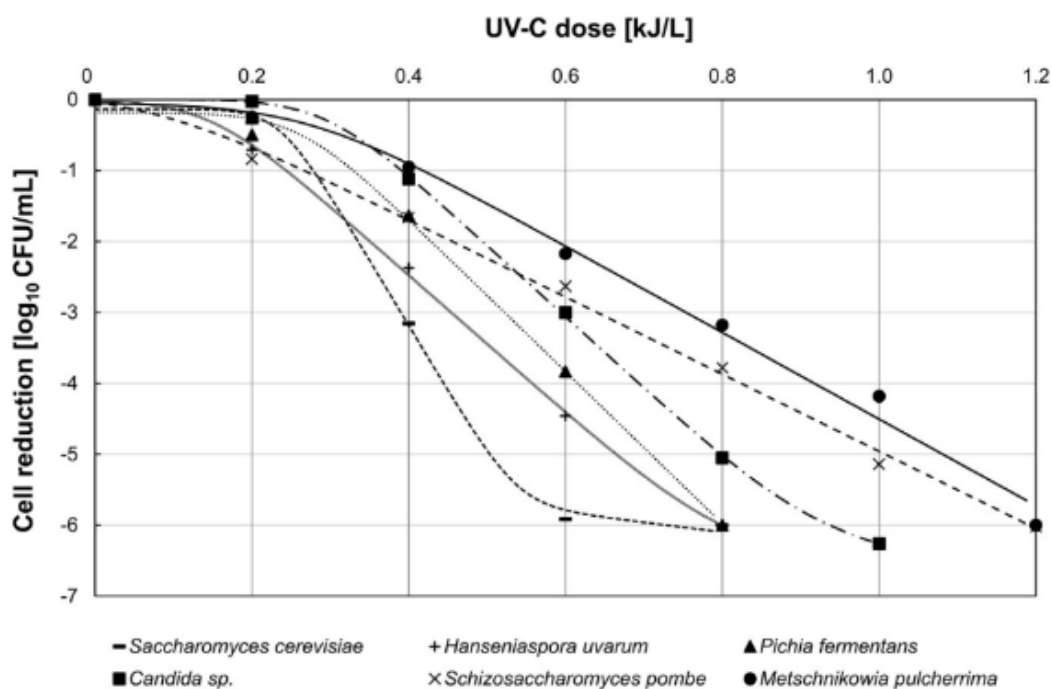


Figure 18 : Cinétiques d'inactivation de différentes espèces de levures dans un vin blanc (Junqua et al., 2020)

Durner et al., 2017 se sont intéressés dans un premier temps aux cinétiques d'inactivation de différentes espèces de levure naturellement présentes dans un moût clarifié de Riesling. *S. pombe* s'est avéré une nouvelle fois être l'espèce la moins sensible au traitement UV-C, suivi de *P. fermentans*, *S. cerevisiae* et *H. uvarum*. Alors que *Saccharomyces* et *Hanseniaspora* ont été complètement inactivées à des doses comprises entre 700 et 900 J.L⁻¹, les populations de *S. pombe* et *P. fermentans* étaient toujours dénombrables. Cependant, l'application de doses UV-C supérieures à 1000 J.L⁻¹, a permis l'inactivation de l'ensemble des levures. Dans un second temps, les auteurs ont comparé les cinétiques d'inactivation de *S. pombe*, *B. bruxellensis* et *L. plantarum* inoculées à 10⁵ UFC.mL⁻¹ dans du moût clarifié et pasteurisé de Riesling. *B. bruxellensis* et *L. plantarum* ont révélé des cinétiques d'inactivation équivalentes ainsi qu'une sensibilité beaucoup plus importante que celle exprimée par *S. pombe*. En effet, l'inactivation complète des populations de *B. bruxellensis* et *L. plantarum* a été obtenue avec des doses UV-C comprises entre 600 et 800 J.L⁻¹ tandis que l'inactivation de la population de *S. pombe* a quant à elle nécessité une dose proche de 1000 J.L⁻¹.

L'ensemble de ces résultats suggère que les microorganismes d'altération présentent une sensibilité relativement plus importante et que les doses UV-C nécessaires à leur inactivation spécifique sont plus faibles. L'utilisation de traitement UV-C ciblés spécifiquement sur ces microorganismes d'altération peut permettre de limiter les risques de déviation

organoleptiques d'origine microbiologique, mais aussi ceux liés au traitement UV-C en lui-même. De plus, il est possible d'imaginer que les microorganismes restant dans les moûts ou les vins puissent agir en tant que bio-protecteur en occupant le milieu et en évitant ainsi la croissance de microorganismes d'altération opportunistes.

Les propriétés physico-chimiques du moût ou du vin à traiter ainsi que la diversité des microorganismes qui y résident vont donc fortement influencer sur les doses requises pour la stabilisation microbiologique par traitement UV-C. Enfin, les niveaux de concentration respectifs des différentes populations de microorganisme vont aussi influencer l'efficacité du traitement. En effet, l'absorbance de la matrice à traiter s'intensifie avec l'augmentation des niveaux de population (ADN, protéines, chromophores). De plus, des phénomènes d'agrégation entre les microorganismes peuvent se produire et participer à la protection par effet bouclier d'une partie de la population qui ne sera pas exposée au rayonnement. Ce phénomène est appelé « Shadowing effect ». Dielser et al., en 2019 ont démontré l'effet du niveau de population initial de *S. cerevisiae* sur l'efficacité du traitement UV-C dans un moût de Müller-Thurgau (Figure 19). Les résultats obtenus montrent une inactivation complète de *S. cerevisiae* inoculée à 10^4 , 10^6 et 10^7 UFC.mL⁻¹ avec des doses respectives de 600 J.L⁻¹, 800 J.L⁻¹ et 1200 J.L⁻¹. Le traitement du moût inoculé à 10^8 UFC.mL⁻¹ avec une dose UV-C de 1400 J.L⁻¹ a permis d'obtenir une réduction de 7 log₁₀ UFC.mL⁻¹ plus que satisfaisante selon les auteurs, mais qui reste néanmoins incomplète. Ces résultats montrent clairement que l'efficacité du traitement UV-C diminue avec l'augmentation de la concentration initiale en microorganismes. Les auteurs soulignent que le traitement des moûts avec 600 J.L⁻¹ pourrait s'avérer dans la plupart des situations suffisant étant donné que les populations levuriennes dans les moûts clarifiés varient (selon Chambers et al., 2010) entre 10^3 et 10^4 UFC.mL⁻¹.

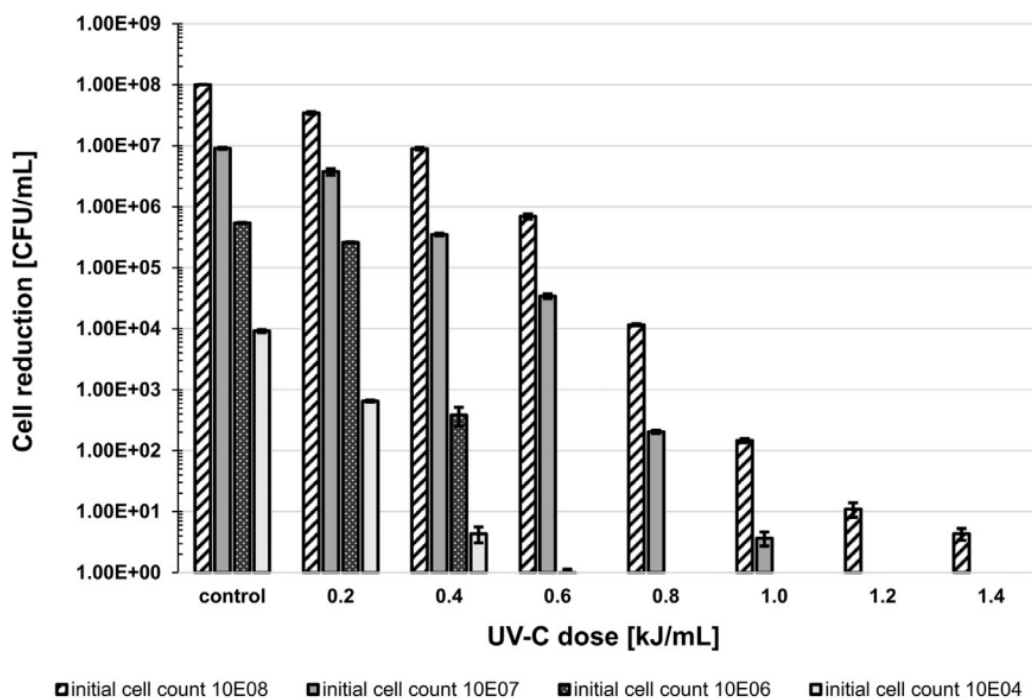


Figure 19 : Impact du niveau de population initial sur les doses UV-C nécessaires à la stabilisation microbiologique (Diesler et al., 2019)

Les exemples d'utilisation du rayonnement UV-C pour la stabilisation microbiologique des vins se multiplient. Ces résultats démontrent que l'absorbance du vin, la nature des micro-organismes ainsi que leur niveau de population sont les paramètres les plus impactant vis-à-vis de l'efficacité du procédé. Cependant, ces résultats démontrent aussi le potentiel du procédé et ses nombreuses applications envisageables en œnologie. Le traitement UV-C pourrait permettre de diminuer les ajouts de SO₂ à certaines étapes de la vinification telles que le traitement des moûts à la réception de la vendange, pour le mutage du vin, pour bloquer/retarder la fermentation malolactique, pour assurer la stabilité microbiologique pendant le vieillissement du vin et enfin juste avant la mise en bouteille.

V.5.2. Impact des UV-C sur la qualité organoleptique des moûts et des vins

V.5.2.1. Le goût de lumière

Le goût de lumière est un défaut du vin principalement lié à un mécanisme d'oxydation photochimique (Fracassetti et al., 2021). Ce défaut est caractérisé par l'apparition d'odeurs de soufre, de chou cuit et d'oignon dans les vins. Son apparition arrive après une exposition plus ou moins longue à des rayonnements dans l'UV-Vis et en particulier entre 370 et 450 nm (UV-

A ; Lumière bleue). Cette altération concerne tous les types de vins, mais plus particulièrement les vins blancs et rosés, tranquilles et pétillants, généralement conditionnés dans des bouteilles en verre transparent, inefficaces pour la protection contre les longueurs d'onde nocives.

La riboflavine (RF) (vitamine B2 ou lactoflavine), est une vitamine hautement photosensible et absorbante dans le domaine UV (maximum d'absorption atteint à 225, 275, 370 et 450 nm) (Drossler et al., 2003). Ce composé joue un rôle crucial dans l'apparition du goût de lumière dans les vins. Lorsque la RF est exposée à un rayonnement, elle agit comme un photosensibilisateur. Un photosensibilisateur est un composé qui, lorsqu'il est irradié à une longueur d'onde plus ou moins spécifique, a la capacité de transférer son énergie d'excitation électronique à un autre composé. Lorsque la RF est exposée à la lumière, elle atteint l'état de triplet excité ce qui lui confère la capacité d'oxyder directement ou indirectement de nombreux composés présents dans le milieu (Cardoso et al., 2012). Il existe alors deux voies possibles de photo-oxydation. Le mécanisme de type I est une oxydation directe du substrat par la RF excitée. La RF à l'état de triplet excité agit comme un accepteur d'électron ou de proton et réagit directement avec des composés capables de les céder, tels que les phénols et les acides aminés. Cette réaction conduit à la production de radicaux libres ou d'ions radicaux libres qui peuvent par la suite initier des réactions en chaîne en attirant l'hydrogène ou les électrons d'autres composés. La RF sous forme radicalaire réduite ou radicalaire anionique peut ensuite retrouver son état fondamental par réduction d'une molécule de dioxygène ce qui conduit à la formation d'un anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (Figure 20). Ce dernier peut alors former par dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui peut à son tour réagir avec un anion superoxyde pour former des radicaux hydroxyles $HO\cdot$ (Réaction de Haber-Weiss) (Fracassetti et al., 2021 ; Choe et al., 2005). Ces espèces oxydantes fortes, peuvent déclencher d'éventuels processus d'oxydation supplémentaires et provoquer l'épuisement des antioxydants présents dans le vin. Le mécanisme de type II correspond à une oxydation indirecte du substrat. Dans ce mécanisme, la RF à l'état de triplet excité réagit avec l'oxygène présent dans le milieu ce qui conduit au retour de la RF à son état fondamental ainsi qu'à la formation d'une molécule d'oxygène à l'état singulet (1O).

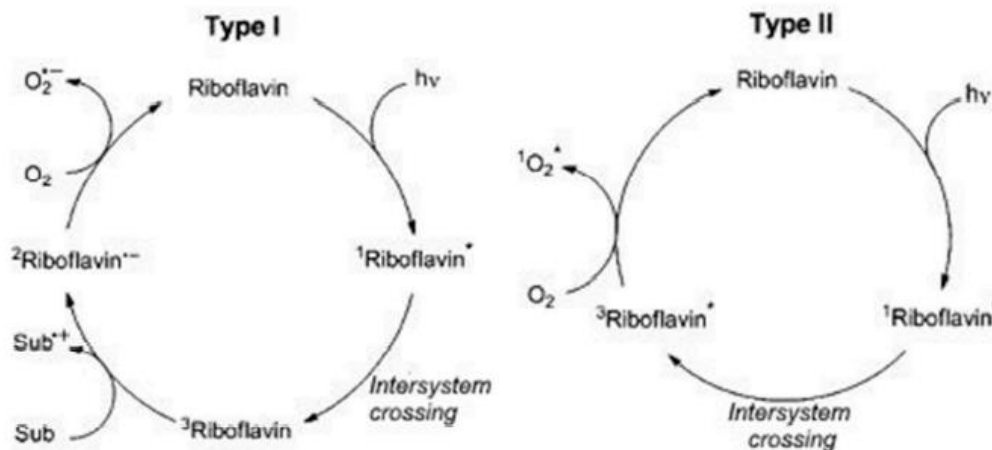


Figure 20 Mécanismes de type I et II de photosensibilisation de la riboflavine (Cardoso et al., 2012)

L'oxygène singulet réagit rapidement avec des composés riches en électrons tels que les acides aminés ou des composés phénoliques qui sont alors oxydés. En ce qui concerne les acides aminés, l'oxygène singulet réagit principalement avec le tryptophane, l'histidine, la tyrosine, la méthionine et la cystéine (Huvaere et Skibsted, 2015 ; Min et Boff, 2002). Le tryptophane, l'histidine et la tyrosine contiennent de doubles liaisons dans leur structure, la méthionine et la cystéine contiennent un atome de soufre avec quatre électrons non liés ce qui les rend sensibles à l'action de l'oxygène singulet électrophile (Fracassetti et al., 2021). L'apparition des deux mécanismes photo-oxydants dépend de la concentration d'oxygène dans l'environnement réactionnel. Dans des conditions anoxiques, seul le type I se produit, alors qu'en présence d'oxygène, les deux mécanismes peuvent avoir lieu.

L'apparition du goût de lumière dans les vins serait liée à la photo-oxydation d'acides aminés, en particulier la méthionine qui présente un atome de soufre. Cependant, l'implication de la cystéine est aussi suspectée. Au cours de la réaction entre la RF excitée et la méthionine, la méthionine subit une décarboxylation puis la perte d'un atome d'hydrogène ce qui conduit à la formation d'une imine (Figure 21).

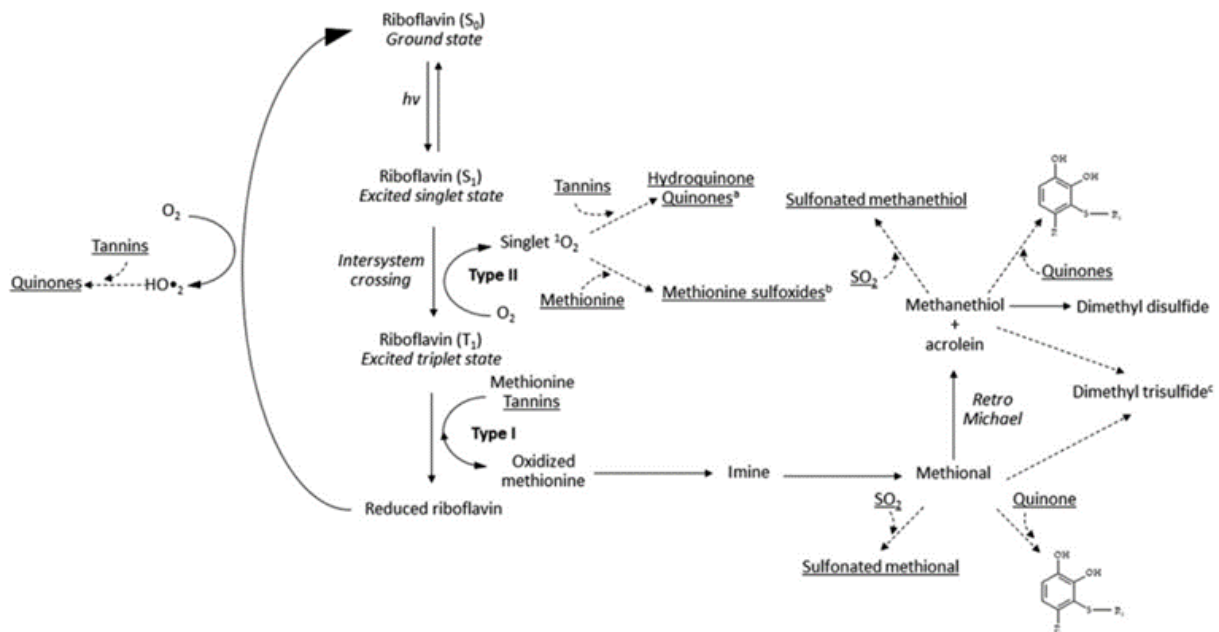


Figure 21 : Schéma réactionnel de la photodégradation de la méthionine et de la riboflavine (Fracassetti et al., 2021)

L'imine formée s'hydrolyse rapidement en méthional. Ce dernier, également chimiquement instable et photosensible, conduit à la formation de méthanethiol (MeSH) et d'acroléine (Réaction de rétro-Michael). Deux molécules de MeSH peuvent ensuite conduire à la formation de disulfure de diméthyle (DMDS) (Maujean et Seguin, 1983a). Ces composés soufrés sont très volatils et ont un seuil de perception bas, de l'ordre de 0,3 g.L⁻¹ en solution modèle ou de 2 à 10 µg.L⁻¹ dans le vin pour le MeSH, 20 à 45 µg.L⁻¹ dans le vin pour le DMDS (Fracassetti et Vigentini, 2018 ; Mestres et al., 2000 ; Pripis-Nicolau et al., 2004). L'odeur du MeSH est caractérisée par des notes olfactives d'œuf pourri et de chou, le DMDS quant à lui confère un arôme de chou cuit et d'oignon. Le MeSH et le DMDS sont considérés comme les principaux composés impliqués dans le goût de lumière.

Le mécanisme d'apparition de ce défaut dans les vins est complexe, et certains aspects doivent encore être élucidés. Récemment, Asaduzzaman et al. (2020), ont démontré qu'au cours des premières étapes de la photo-oxydation, le MeSH peut être généré par une voie alternative et plus rapide, qui n'inclut pas le méthional comme intermédiaire réactionnel, mais qui impliquerait un clivage direct de la chaîne latérale de la méthionine.

En résumé, le rayonnement UV peut induire des phénomènes oxydatifs importants via des phénomènes directs ou indirects de photo-oxydation liés à l'excitation de la riboflavine. Il est cependant nécessaire de préciser que ces mécanismes ont été principalement étudiés sur des périodes d'exposition longue (plusieurs heures à plusieurs jours) et pour un rayonnement le

plus souvent dans le domaine des UV-A et B ainsi que la partie visible du spectre électromagnétique. À l'heure actuelle, une seule étude fait référence à l'apparition du goût de lumière dans un vin suite à une exposition à un rayonnement à 254 nm. Les auteurs (Davaux et al., 2011) ont observé que le profil aromatique du sauvignon blanc traité à forte dose UV-C ($11\ 000\ \text{J.L}^{-1}$) présentait un défaut notable de « réduction » tandis que ce défaut n'apparaissait pas lors des traitements de faible intensité ($< 2000\ \text{J.L}^{-1}$). Ces observations semblent en effet correspondre aux phénomènes imputables aux réactions photochimiques détaillées précédemment, à savoir la photo-oxydation et l'oxydation via formation de radicaux libres. Cependant, l'apparition de ce défaut n'a eu lieu quand le cas d'un traitement dont l'intensité était très fortement supérieure aux intensités utilisées dans les différentes études, même pour la stabilisation des vins les plus absorbants.

V.5.2.2. Vieillesse prématurée des vins : 2-aminoacétophénone (AAP)

Le vieillissement aromatique prématuré des vins est un défaut caractérisé par l'apparition d'arômes de cire, de laine humide, de naphthaline ou encore de fleur d'acacia. La 2-aminoacétophénone (AAP) est considérée comme le composé clé responsable de l'UTA dans les vins, son seuil de perception dans le vin est rapporté entre $0.5\ \text{g.L}^{-1}$ et $1.5\ \mu\text{g.L}^{-1}$ (Schneider, 2014). La AAP est formée à partir de l'acide indole-3-acétique au cours du vieillissement des vins (Hoenicke, 2002). Cependant, Horlacher et Schwack (2014) ont démontré que la photo-oxydation du tryptophane (libre et lié) pouvait aussi induire la formation d'AAP dans un vin modèle. Diesler et al en 2019, ont noté une augmentation significative du caractère « fleur d'acacia » ainsi qu'une diminution du caractère fruité dans des vins issus de moûts traités avec des doses UV-C de l'ordre de $20\ \text{kJ.L}^{-1}$. Golombek et al., en 2021 ont étudié l'impact de différents traitements UV-C ($1.6, 6, 20$ et $21\ \text{kJ.L}^{-1}$) sur les concentrations en tryptophane et AAP dans des moûts de Riesling traités et les vins issus de leurs vinifications (deux millésimes, 2016 et 2017). Une diminution significative du tryptophane dans le moût a été observée pour le traitement UV-C à $21\ \text{kJ.L}^{-1}$ pour le millésime 2017. Les traitements avec 20 ou $21\ \text{kJ.L}^{-1}$ ont entraîné la formation de $0.5\ \mu\text{g.L}^{-1}$ de 2-AAP dans les moûts pour les deux millésimes. Seuls les moûts traités avec des doses UV-C de 20 et $21\ \text{kJ.L}^{-1}$ ont conduit à des concentrations en AAP dans les vins proches du seuil de perception. Cependant, le vin issu du traitement UV-C à $6\ \text{kJ.L}^{-1}$ présentait un profil marqué par des notes de fleur d'acacia et de serviette humide malgré une concentration en AAP inférieure au seuil de perception ($0.3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) dans le vin après mise

en bouteille. Ces travaux démontrent que le rayonnement UV-C peut effectivement induire une augmentation de l'AAP dans les moûts et les vins, cependant, uniquement avec des doses qui sont 10 à 20 fois supérieures à celles recommandées pour la stabilisation microbiologique de ces vins.

V.5.2.3. Autres impacts sur la composition volatile des vins.

Ces phénomènes de photo-oxydation, peuvent aussi impacter les concentrations en composés volatils d'intérêt dans les moûts et les vins. Les réactions d'oxydation en chaîne initiée par la photo excitation de la RF ainsi que l'interaction directe de certaines molécules avec le rayonnement hautement énergétique peuvent conduire à la modification de la composition volatile. Golombek et al 2021, ont observé une diminution significative de certains terpènes, des composés C13-norisoprénoïdes, des alcools supérieurs, des esters éthyliques et d'acétate d'alcools supérieurs dans des moûts de Riesling traités avec des doses importantes d'UV-C (6 kJ.L^{-1} et 21 kJ.L^{-1}) et dans les vins obtenus à partir de ces moûts. La dégradation ou la transformation de ces composés est la résultante des phénomènes oxydatifs directs ou indirects initiés par la photo-excitation de la RF. De plus certaines molécules impactées (notamment le 2-phényléthanol) sont fortement absorbantes à des longueurs d'onde proches de 254 nm et sont donc aptes à réagir directement sous l'effet du rayonnement. Dans cette même étude, les moûts traités avec une dose UV-C de 21 kJ.L^{-1} présentaient des concentrations significativement plus élevées en furanes (alcool furfurylique et 3-furaldéhyde). L'alcool furfurylique présente une odeur de brûlé tandis que le 3-furaldéhyde à une odeur d'amande proche de celle du benzaldéhyde. D'autres composés furaniques tels que l'hydroxyméthyl-2-furfural sont associés à des arômes désagréables, tels que « carton/papier ». Ces composés sont généralement issus de réactions de Maillard au cours de la dégradation thermique de sucres et d'acides aminés (Hoydonckx et al., 2000). Cependant, la formation de ces composés a également été observée suite à l'exposition de cidre au rayonnement UV-C (Fan et Geveke, 2007). Ces différences n'ont cependant, pas été retrouvées dans les vins issus de ces moûts traités, ce qui selon les auteurs pourrait s'expliquer par une forte volatilité de ces composés et donc leur élimination avec le CO_2 généré au cours de la FA. Ces résultats obtenus après des traitements à 6 kJ.L^{-1} et 21 kJ.L^{-1} montrent que le rayonnement UV-C n'est pas sans effet sur le vin, mais indiquent aussi qu'aux doses requises pour la stabilisation microbiologique, ces phénomènes n'impactent pas le vin de manière

significative. En effet, avec des doses égales ou inférieures à 2 kJ.L^{-1} , les auteurs n'ont observé aucune différence significative entre le moût témoin et les moûts traités aux UV-C, de même pour les vins issus de ces moûts. Junqua et al en 2020, ont étudié l'impact d'un traitement UV-C sur un vin blanc liquoreux et un vin rouge. Le vin blanc liquoreux a été avec une dose 1740 J.L^{-1} tandis que le vin rouge a reçu une dose de 2610 J.L^{-1} . Les analyse des paramètres physico-chimiques standard, de la composition phénolique, de la composition volatile ont été réalisées pendant 6 mois suite aux traitements et n'ont montré aucune différence significative entre les vins témoins et les vins traités aux UV-C. Des séances d'analyses sensorielles n'ont révélé aucun impact perceptible des traitements sur les vins (tests triangulaires). On trouve dans la littérature un grand nombre d'informations sur l'impact du rayonnement UV-C sur un grand nombre de molécules du vin. Les résultats concernant l'impact des traitements UV-C varient selon les études. La grande variabilité des produits traités, des doses UV-C administrées et des réacteurs UV-C utilisés rend la synthèse des résultats compliquée.

Cependant, les travaux qui font état de modifications significatives suite au traitement UV-C ont été réalisés essentiellement avec des doses UV-C 10 à 20 fois plus importantes que celles recommandées pour la stabilisation microbiologique.

V.5.2.4. Composition phénolique et brunissement des vins

Les photons émis lors du rayonnement UV-C à 254 nm sont absorbés par les molécules organiques et affectent les liaisons conjuguées telles que les cycles aromatiques, les doubles cycles ou encore des composés comprenant des liaisons disulfure (Koutchma et al., 2009). Dans le vin, les composés phénoliques, de par leur structure sont parmi les composés les plus à même de réagir directement avec le rayonnement, mais aussi avec la RF à l'état de triplet excité et les ERO présents dans le milieu (Huvaere et Skibsted, 2015). Les composés phénoliques absorbent ainsi directement une grande partie du rayonnement UV-C et des phénomènes oxydatifs. La réaction entre un composé phénolique avec la RF à l'état triplet excité ou avec des ERO entraîne la dégradation oxydative des phénols (Cardoso et al., 2012). L'oxydation des composés phénoliques induit entre autres la formation de quinone et favorise les réactions de polymérisation, de copigmentation et de condensation. Ces réactions peuvent induire une modification de la couleur et de la capacité antioxydante des vins. De plus, les quinones sont notamment connues pour leur capacité à piéger les thiols variétaux et peuvent impacter la composition volatile des vins. L'oxydation de l'acide tartrique joue un rôle

important dans le brunissement des vins. L'acide tartrique est l'un des composés majoritaires du vin, son oxydation conduit à la formation de glyoxal et d'acide glyoxylique. Ces deux composés sont impliqués dans les réactions de condensation de deux unités flavanols qui conduisent à la formation d'une structure xanthylum de couleur jaune (Fracassetti et al. 2021). Le brunissement des vins, souvent associé avec l'apparition du goût de lumière, est le résultat d'une oxydation rapide des composés phénoliques du vin. C'est pourquoi généralement les travaux visant à étudier l'impact du traitement UV-C sur les vins ou autres jus s'intéressent à l'évolution de la couleur et à la composition phénolique des produits avant et après traitement.

Une fois de plus, les résultats concernant l'impact des traitements UV-C sur la composition phénolique varient selon les études. La grande variabilité des produits traités, des doses UV-C administrées et des réacteurs UV-C utilisés rend la synthèse des résultats difficile à retranscrire.

Pala et Toklucu (2011) ont étudié l'impact d'un traitement UV-C sur la composition phénolique de jus de grenade. Des traitements avec des doses allant jusqu'à 62.35 J.mL^{-1} ont été appliqués sur le jus. Les auteurs n'ont observé aucune différence significative au niveau des paramètres suivants : anthocyanes totales, anthocyanes moléculaires, polyphénols totaux et capacité antioxydante du jus. De la même façon, différentes études portant sur le traitement de jus de pomme, de cidre, de moût de raisin ainsi que de vins n'ont montré aucune modification significative de la composition phénolique ainsi que de la couleur des produits après traitement (Junqua et al., 2020 ; Durner et al., 2017 ; Lorenzini et al., 2010 ; Guerrero-Beltran et al., 2009 ; Islam et al., 2016)

Ces résultats semblent indiquer qu'aux doses nécessaires pour la stabilisation microbiologique des moûts et des vins, l'impact du procédé UV-C est faible voir non significatif dans la majorité des cas. Cependant, l'utilisation de doses importantes présente un risque de modification de la couleur et de la composition phénolique des vins. D'une manière générale l'impact du procédé UV-C sur les moûts et vin semble être principalement lié à la dose UV-C appliquée. Il est donc essentiel de déterminer les doses minimales requises pour la stabilisation microbiologique en fonction des différents profils de vins et de microorganismes cibles et de travailler avec des réacteurs UV-C permettant de les appliquer précisément et de façon homogène.

V.5.2.5. Cytotoxicité et mutagénicité des UV

Le rayonnement UV en interagissant avec les composants des jus peut potentiellement des sous-produits cancérigènes ou mutagènes. En effet, les phénomènes oxydatifs induits par les UV-C donnent lieu à la formation de ERO dans les produits alimentaires traités. Les ERO sont connus pour leur capacité à produire des dommages génétiques qui peuvent induire des mutations (Patrineli et al., 1996). Différents tests ont été développés pour étudier les propriétés génotoxiques des produits chimiques dans les aliments et l'environnement. Le test d'Ames, permet d'évaluer la capacité d'un produit à induire des mutations dans des souches spécifiques de *Salmonella typhimurium* rendues auxotrophes à l'histidine (Maron et Ames 1983). Le principe de ce test repose sur différentes souches bactériennes de *S. typhimurium* portant des mutations dans les gènes nécessaires à la synthèse de l'histidine (His⁻). Ainsi, celles-ci sont donc auxotrophes pour l'histidine et requièrent par conséquent un apport d'histidine dans leur milieu de culture pour se développer. Ces souches sont mises au contact du produit que l'on souhaite évaluer vis-à-vis de son pouvoir mutagène et cytotoxique. Dans le cas d'une substance mutagène, on observe ainsi l'apparition de souche prototrophes, ne nécessitant plus un apport extérieur d'histidine pour croître. Autrement dit, on étudie le nombre de souches de départ (His⁻) qui mutent en souche (His⁺) sous l'effet de la substance mutagène. Ce phénomène est appelé mutation réverse et conduit à l'apparition de bactéries mutées appelées « révertants ». Le test permet donc d'évaluer la facilité que possède une substance à induire une réversion de la souche auxotrophe.

Une seule étude de ce genre a été réalisée sur des moûts de raisin traité aux UV-C et à l'heure actuelle aucune étude ne s'est pas penchée sur la mutagénicité de vins traités aux UV-C. Selon (Diesler et al.,2019), la mutagénicité de moûts de Pinot noir, de Riesling et de Pinot blanc a été évaluée avant et après traitement avec des doses UV-C allant jusqu'à 18 kJ.L⁻¹. Les auteurs ont comparé l'effet mutagène des moûts traités aux UV-C par rapport à celui des moûts non traités, à l'aide de 4 souches de *S. typhimurium* His⁻ (TA98, TA100, TA1535 et TA1537). Pour conclure sur une augmentation de l'effet mutagène liée au traitement UV-C, le nombre de révertants doit au minimum doubler entre les moûts traités et les moûts témoins. Les auteurs n'ont observé aucune augmentation significative du nombre de révertants dans les moûts traités aux UV-C et ce même avec des doses allant jusqu'à 18 kJ.L⁻¹. Ces résultats suggèrent donc que l'utilisation du procédé UV-C à des doses suffisantes pour la stabilisation

microbiologique n'augmente pas de manière significative la toxicité des moûts traités. Cependant, aucune étude ne s'est penchée sur une éventuelle augmentation de la toxicité liée au traitement UV-C de vins finis.

V.6. Conclusion

Au regard des résultats prometteurs, il nous a semblé essentiel de conforter ces résultats prometteurs sur une étude plus complète. L'objet de ce travail est de proposer des procédés innovants permettant de maîtriser la qualité organoleptique et sanitaires des produits à l'échelle industrielle. Ces nouvelles technologies fiables et robustes pourront permettre de diminuer sensiblement les quantités de dioxyde de soufre et permettra de s'adapter à la demande des nouveaux marchés. Les techniques alternatives doivent proposer plusieurs avantages pour les producteurs. Les procédés doivent être athermiques, propres, rapides, peu chères, efficaces, continus et automatisables. Comparée à d'autres traitements tels que la pasteurisation, la consommation d'énergie se doit d'être plus faible (quelques dizaines de kWh/m³). Pour faire avancer les connaissances sur l'utilisation des UV-C, nous avons traité plusieurs matrices différentes pour évaluer l'impact de ce procédé sur des vins issus de cépages différents. D'autre part, une étude a été réalisée dans le but d'évaluer les niveaux de sensibilité au rayonnement UV-C des principales levures rencontrées en œnologie et d'identifier d'éventuelles souches ou espèces qui présenteraient une résistance à ce procédé. Ces résultats permettront de conseiller plus finement les utilisateurs et d'adapter les traitements en fonction des différents microorganismes et profils de vin afin d'éviter tout risque de déviation organoleptique.

VI. Les procédés athermiques innovants : La lumière pulsée

VI.1. Principe général de la lumière pulsée

La lumière pulsée (LP) correspond à l'application d'une lumière intense sous forme d'impulsions courtes (généralement de 1 μ s à 0.1 s) sur une cible d'intérêt (aliments liquides et solides ou surface de contact alimentaire) visant à détruire les bactéries, levures, moisissures et virus qui y sont présents. La LP correspond à l'émission de lumière blanche à une intensité très élevée et dont l'application est réalisée sur de très courtes périodes de temps (flashes). Le spectre d'émission électromagnétique de la LP est similaire à celui de la lumière solaire et contrairement au rayonnement UV-C il n'est pas monochromatique. Le

spectre d'émission de la LP va de l'UV au proche infrarouge (IR). Cette gamme de rayonnement électromagnétique comprend les rayons UV ($\lambda = 200 - 400$ nm ; UV-C : 200 - 280 nm, UV-B : 280 - 315 nm, UV-A : 315 - 400 nm), la lumière visible ($\lambda = 400 - 700$ nm) et les IR ($\lambda = 700 - 1100$ nm) (Mandal et al., 2020)(Figure 22).



Figure 22 : Spectre d'émission de la lumière pulsée

Les premiers travaux de désinfection par LP ont été réalisés à la fin des années 1970 au Japon, et le premier brevet basé sur cette technologie date de 1984 (Hiramoto, 1984) (Wekhof et al., 2000). Depuis, les exemples d'utilisation de la LP se sont multipliés, notamment pour la décontamination de l'air, de matériel médical, de fruits et légumes, de viande, d'emballages alimentaires, mais aussi pour des liquides peu absorbants tels que l'eau (Mandal et al., 2020). En tant que procédé basé sur l'utilisation d'un rayonnement, la LP est confrontée aux mêmes limites que les UV-C, et concerne l'ensemble des phénomènes physico-chimique qui protègent les microorganismes du rayonnement (absorbance, turbidité, rugosité...). De nos jours, plusieurs équipes de recherche déploient des efforts pour étendre l'utilisation de ce procédé au traitement des liquides les plus opaques et des surfaces les plus rugueuses.

Un système de LP (Figure 23) consiste en une unité d'alimentation qui génère un courant continu haute tension à partir de courant alternatif basse tension. Le courant généré est accumulé dans des condensateurs. Le courant électrique concentré est ensuite libéré sous la forme d'impulsions électriques de haute puissance par un interrupteur qui effectue des cycles marche/arrêt de courtes durées allant de la microseconde jusqu'au dixième de seconde. Ces impulsions sont ensuite délivrées dans une lampe contenant un gaz, généralement du xénon. Les impulsions électriques excitent alors le xénon qui en revenant à un état énergétique

inférieur ou à son état fondamental dégage un rayonnement de haute intensité à une fréquence induite par la fréquence de libération des impulsions électriques.

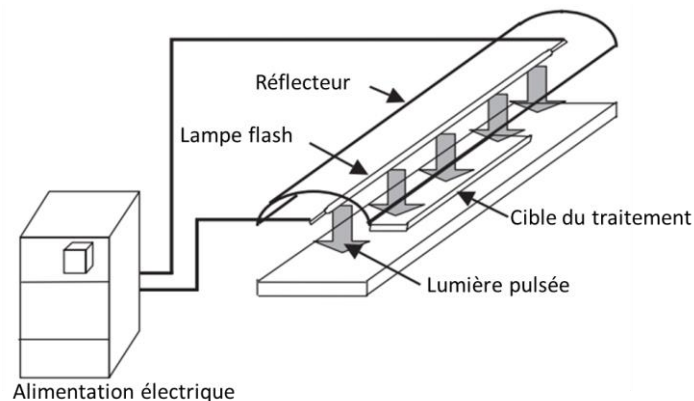


Figure 23 : Schémas d'un dispositif de lumière pulsée.

Les travaux affirmant que la LP dispose d'une efficacité supérieure par rapport aux UV-C sont parfois remis en question. Il apparaît que l'optimisation des conditions opératoires soit un facteur clé à évaluer. Plusieurs propriétés de la LP peuvent expliquer une éventuelle efficacité supérieure par rapport aux UV-C continus :

- L'effet crête (« Peak power effect ») pourtant contradictoire avec la loi de Bunsen-Roscoe semble jouer un rôle dans l'efficacité du traitement par LP. Des études ont montré une meilleure efficacité du traitement par LP lorsque la fluence est obtenue avec un nombre limité de flashes de haute intensité par rapport à l'application de la même fluence totale avec un plus grand nombre de flashes d'intensité inférieure (Kramer et al., 2017). La théorie la plus probable postule que le flux important de photons émis au cours d'un flash submerge les mécanismes de réparation cellulaire (Gomez-Lopez et al., 2007).
- La profondeur de pénétration de la lumière dans une substance augmente à mesure que la longueur d'onde de la lumière diminue. Le spectre d'émission de la LP comprend des longueurs d'onde de 200 à 1100 nm, les longueurs d'onde inférieures d'environ 200 nm ont donc en théorie une profondeur de pénétration plus élevée que le rayonnement à 254 nm émis par les UV-C continus.
- La plus grande diversité des longueurs d'ondes émises par la LP la rend moins sensible à des phénomènes d'absorbances ponctuels. Si certaines longueurs d'onde du rayonnement sont fortement absorbées, les parties non absorbées du spectre d'émission peuvent toujours contribuer à la stabilisation microbiologique.

- L'émission d'un rayonnement à spectre large (200 - 1100 nm) à haute intensité induit différents mécanismes germicides dont les effets cumulés contribuent à la stabilisation microbiologique. Ces différents mécanismes germicides seront présentés dans la partie suivante.

La loi de réciprocité de Bunsen-Roscoe affirme que pour une même fluence, l'efficacité du rayonnement est la même peu importe que la fluence soit obtenue avec un taux de fluence élevé et un temps d'exposition court ou avec un taux de fluence faible et un temps d'exposition long. Cependant, différents travaux décrivent une plus grande efficacité de la LP à fluence équivalente notamment pour l'élimination d'*E. coli* (Zou et al., 2019 ; Bhavya et al., 2017). Les résultats rapportés par Takeshita et al. (2003), vont également à l'encontre du principe de Bunsen-Roscoe. Les auteurs ont étudié l'impact de la LP sur des levures *S. cerevisiae*. Les levures ont été traitées avec des fluences totales équivalentes, mais distribuées différemment. Certaines ont reçu un grand nombre de flashes de faible intensité et d'autre un nombre moins importants de flash, mais de plus haute intensité. Leurs résultats ont révélé que l'utilisation de puissance élevée permettait une augmentation de l'effet germicide. De plus dans ces conditions ils ont pu noter l'augmentation des concentrations en protéines intracellulaires dans le milieu extracellulaire révélant ainsi des phénomènes d'altération des membranes liés à l'effet « crête ».

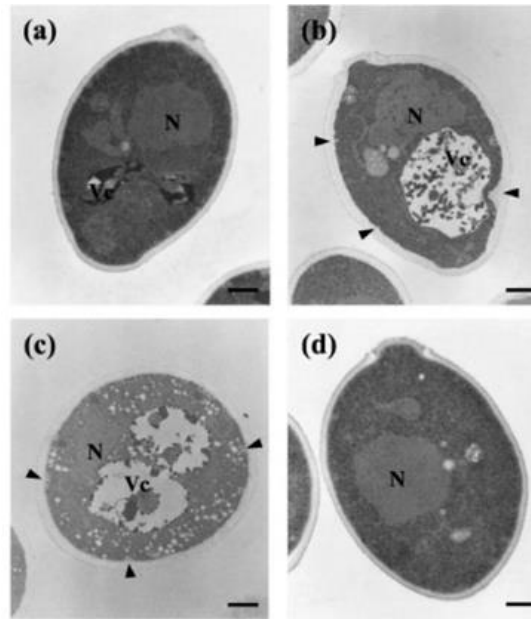
La lumière pulsée, à fluence équivalente présenterait donc un potentiel germicide plus important que les UV-C. En plus de cela la LP permet par rapport aux UV-C continus, une diminution importante des temps de traitement. A titre d'exemple, Rice et al., (2001) au cours de leurs travaux ont eu besoin de 3 heures pour délivrer une fluence de 104 J.m^{-2} à l'aide d'un dispositif UV-C continu et de seulement 40 secondes pour délivrer une fluence équivalente à l'aide d'un dispositif de LP. Enfin, la LP présente l'avantage d'utiliser des lampes à xénon, plus respectueuses de l'environnement étant donné qu'elles ne contiennent pas de mercure. Cependant, en tant procédé destiné à l'industrie agro-alimentaire son impact sur les qualités organoleptiques des produits traités doit aussi être pris en compte. L'échauffement important lié au traitement par LP, est à l'heure actuelle l'un des aspects les plus contraignant lié à son utilisation (avec les problématiques de pénétration du rayonnement). L'augmentation des températures au cours des traitements est due aux températures élevées de fonctionnement des lampes ainsi qu'à l'absorption du rayonnement par le produit, particulièrement dans le

domaine infra-rouge. De plus, le procédé est connu pour sa capacité à générer de l’ozone, ce gaz d’intérêt pour la stabilisation microbiologique peut cependant présenter un risque important d’oxydation du produit. Enfin, le spectre large d’émission augmente les risques d’interactions photochimiques pouvant mener à des déviations organoleptiques. Afin d’améliorer les performances du procédé et de diminuer les risques de déviations organoleptiques plusieurs améliorations sont possibles et seront nécessaires. L’ajout de systèmes de refroidissement et de ventilation efficaces peuvent permettre de limiter les phénomènes d’échauffement et de génération d’ozone. L’utilisation de filtres optiques bloquant spécifiquement les longueurs d’onde ne participant pas à l’effet germicide du procédé pourrait permettre de diminuer les risques de déviations organoleptiques. Enfin, tout comme pour les UV-C, la conception de réacteur permettant l’optimisation de la mise au contact des microorganismes avec le rayonnement permet de diminuer les fluences nécessaires à la stabilisation ainsi que les temps d’exposition et donc les risques de modification de la qualité des produits traités (Mandal et al., 2021). L’application de la LP doit être réfléchie afin d’éviter toutes dérives.

VI.2. Les mécanismes germicides de la LP

L’effet photochimique induit par le rayonnement UV-C (décrit précédemment) est essentiel pour la stabilisation microbiologique par LP, il a été démontré que l’utilisation d’un filtre optique éliminant les longueurs d’onde inférieures à 320 nm entraînait une perte complète de l’efficacité germicide du procédé (Takeshita et al., 2002). Cependant, il semble que les régions visibles et infrarouges du spectre d’émission puissent également contribuer à l’inactivation des microorganismes via des mécanismes photothermiques et effet photophysiques. L’effet photothermique est essentiellement dû à l’absorption de rayonnement infrarouge et correspond à des phénomènes d’échauffement intenses et instantanés des microorganismes exposés au rayonnement de haute intensité émis par LP (Mandal et al., 2020). Cette augmentation intense et instantanée provoque des échauffements localisés au sein des microorganismes. Ces phénomènes induisent l’altération de l’intégrité des membranes cellulaires, la vaporisation de l’eau contenue dans le milieu intracellulaire et peuvent ainsi provoquer à l’éclatement de la cellule (Takeshita et al., 2003 ; Wekhof et al., 2001). Certaines études ont montré que des traitements prolongés par LP pouvaient conduire à une augmentation importante de la température du produit, avec

quelquefois des valeurs proches ou même très supérieures aux températures utilisées au cours d'une pasteurisation classique (60 - 70 °C) (Mandal et al., 2020). Cependant, la LP étant étudiée comme un procédé alternatif athermique, ces phénomènes d'échauffement trop important sont à éviter afin de préserver au mieux les propriétés organoleptiques des produits traités. L'effet photophysique de la LP a également été identifié comme un facteur contribuant à l'inactivation microbiologique. Krishnamurthy et al., (2010) ont démontré la capacité des flashes de haute intensité à endommager la structure cellulaire. Ils ont notamment pu observer par microscopie électronique à transmission (MET) des lésions de la paroi cellulaire, un rétrécissement de la membrane plasmique ainsi que des fuites au niveau d'organites intracellulaires. Des lésions équivalentes suite à des traitements par LP ont été également observées dans l'étude de Takeshita et al., en 2003. La plus grande fréquence d'apparition de dommages structurels induits par LP par rapport aux UV-C continu montre un effet contributif des effets photophysique et photothermique sur l'inactivation microbienne (Figure 24). Il est complexe de différencier les dommages induits par l'effet photothermique de ceux liés à l'effet photophysique et donc de déterminer les niveaux respectifs de contribution de ces deux phénomènes. Avec l'effet photochimique, ces mécanismes sont responsables de l'inactivation des microorganismes indépendamment ou en combinaison les uns avec les autres, avec des niveaux de contributions variables en fonction des conditions de traitement, des propriétés physico-chimiques des produits traités et des organismes cibles (Mandal et al.,). Cependant, il est communément admis que l'effet photochimique de la lumière (décrit dans la partie V.2) induit par le rayonnement dans le domaine UV, est le principal responsable de l'inactivation des microorganismes.



(a) Témoin, (b) LP : 2 flashes de $0,7 \text{ J.cm}^{-2}$, (c) LP : 3 flashes de $0,7 \text{ J.cm}^{-2}$, (d) UV-C : 3s à 60 mJ.cm^{-2} ; Barre : $0,5 \mu\text{m}$; N : noyau ; Vc : vacuole ; Fleche : membrane endommagée.

Figure 24 Observation par microscopie à transmission électronique de cellules de *S. cerevisiae* (Takeshita et al., 2003)

Plusieurs études montrent qu'il existe une grande variabilité au sein des différents genre, espèces et souches de microorganismes vis-à-vis de la sensibilité au traitement par LP. Une tendance a cependant été décrite par Anderson et al., (2000) et Rowan et al. (1999). Avec par ordre de sensibilité décroissante à la LP : les Bactéries Gram-négatives, les Bactéries Gram-positives et les spores. Gomez-Lopez et al., (2005), ont étudié les sensibilités relatives de bactéries, levures et moisissures en leur appliquant des traitements par LP identiques après les avoir inoculés indépendamment sur des boîtes de Pétri. Les auteurs concluent à une sensibilité moindre pour les formes sporulantes, cependant, en raison d'une efficacité trop importante du procédé, ils ne sont pas parvenus à déterminer de tendance entre les levures, champignons et bactéries dans leurs formes végétatives. L'effet germicide étant principalement lié au rayonnement UV, il est possible que la sensibilité plus faible des levures observée dans le contexte du rayonnement UV-C continu soit transposable au procédé de lumière pulsée et des travaux supplémentaire doivent être réalisés sur cet aspect.

VI.3. Impact de la LP sur la qualité des produits traités

L'impact de la LP a été évalué sur un grand nombre de produits alimentaires. La majorité de ces travaux porte sur la stabilisation microbiologique et l'impact du rayonnement pulsé sur la qualité d'aliments solides tels que les fruits et légumes, la viande et le poisson. Les résultats

concernant l'impact du procédé sur les propriétés organoleptiques de liquides alimentaires sont plus rares mais en constante augmentation ces dernières années. On trouve notamment dans la littérature un nombre croissant de travaux portant sur l'application de la LP au traitement de laits (bovin, caprin) et jus variés (pomme, orange, fraise, melon, myrtilles, mûres, anans, etc.). Concernant le jus de pomme, Palgan et al. (2011) n'ont observé aucun changement significatif du degré Brix et du pH après traitement par LP. Cependant, ils ont pu observer une diminution de la teneur en polyphénols totaux et de l'activité antioxydante (en équivalents Trolox) dans les jus traités. Des modifications significatives du profil sensoriel des jus traités ont aussi été notées. Une seconde étude sur du jus de pomme par Munoz et al., (2012) a révélé un impact du traitement sur la couleur des jus traités. Funes et al. (2013) ont démontré que le traitement par LP de jus de pomme et de purée de pomme pouvait induire une diminution de la teneur en patuline (Mycotoxine reconnue pour provoquer des désordres gastro-intestinaux) avec respectivement 22 % et 51 % de diminution dans les jus et la purée. Les travaux de Anugu et al., (2013), n'ont quant à eux démontré aucun impact négatif du traitement par LP sur du vin de myrtille. Leurs résultats ne montrent aucune diminution de la teneur en polyphénols totaux ou de l'activité antioxydante et aucune modification de la couleur des vins de myrtilles traités. Les auteurs ont cependant observé une augmentation des anthocyanes et des flavonoïdes totaux dans les modalités traitées par LP. Cependant, aucun impact significatif des traitements n'a été observé sur la dizaine de composés volatils suivis (esters et alcools supérieurs).

Des travaux récents portant sur l'impact du traitement par LP ont été menés par Vollmer et al., (2020) sur du jus d'ananas. Dans cette étude, les auteurs ont appliqué neuf traitements différents sur des jus d'ananas en mode discontinu (batch). Les traitements correspondaient à l'application de 47, 94 ou 187 flashes, avec trois valeurs de fluence par flash égales à 3.4 J.cm^{-2} , 5.4 J.cm^{-2} et 8.0 J.cm^{-2} . Les auteurs ont observé une diminution significative de l'activité enzymatique de la peroxydase et de la polyphénol oxydase (responsables du brunissement) dans les jus traités par LP. Ces diminutions sont allées jusqu'à 42 % pour la polyphénol oxydase et 50 % pour la peroxydase pour le traitement le plus intense (187 flashes ; 8.0 J.cm^{-2} par flash en moyenne ; fluence totale 1479 J.cm^{-2}). L'étude colorimétrique des jus traités n'a révélé aucun impact perceptible des traitements par LP sur la couleur des produits même après les traitements les plus intenses. Une diminution de la capacité antioxydante des

jus a été observée, uniquement pour les traitements avec 94 et 187 flashes, avec une diminution maximale de 14 % induite par le traitement le plus intense (187 flashes ; $8,0 \text{ J.cm}^{-2}$ par flash en moyenne ; fluence totale 1479 J.cm^{-2}). Les auteurs précisent que cette diminution demeure cependant moins importante que celle observée dans la modalité pasteurisée thermiquement. Les traitements d'intensités faibles à moyennes n'ont eu aucun impact sur la teneur en vitamine C dans les jus. Pour les jus les plus fortement traités une corrélation entre la fluence totale et la diminution des teneurs en vitamines C a été observée. Pour le traitement le plus intense, une diminution de 29 % de la concentration en vitamine C par rapport au témoin non traité a été observée. Une diminution significative des teneurs en composés phénolique a également été mesurée dans l'ensemble des jus traités par LP, avec des pertes moyennes allant de 12 % à 47 % en fonction des paramètres de traitement, les effets les plus préjudiciables étant induits par les modalités comprenant 187 flashes représentant les fluences totales les plus élevées (640, 1028 et 1479 J.cm^{-2}).

A notre connaissance, une seule étude a évalué l'impact de la LP sur le vin. Lopez-Perez et al., (2020) ont étudié l'utilisation l'efficacité et l'impact de la LP pour l'inactivation de *B. bruxellensis* dans un vin blanc sec de Macabeu. Des fluences de 2.1 J.cm^{-2} , 4.3 J.cm^{-2} , 6.4 J.cm^{-2} , 10.7 J.cm^{-2} , 21.4 J.cm^{-2} et 42.8 J.cm^{-2} ont été appliquées à du vin blanc inoculé avec *B. bruxellensis* aux alentours de 10^6 UFC.mL^{-1} . Les traitements ont été réalisés en mode discontinu sur des volumes de 20 mL de vin contenus dans des boîtes de Pétri, placées 7.1 cm sous la lampe. L'inactivation maximum a été obtenue avec l'application de 10.7 J.cm^{-2} (Réduction de 2.1 log) et l'application de fluences plus importante n'a pas permis d'améliorer ce résultat. L'analyse colorimétrique des échantillons après traitements a révélé un impact du procédé corrélé avec l'intensité du traitement. L'application de 42.8 J.cm^{-2} a significativement impacté l'ensemble des caractéristiques colorimètres du vin, avec notamment une diminution de la couleur verte et une augmentation du jaune. Un traitement avec 10.7 J.cm^{-2} a permis d'obtenir le même résultat d'un point de vue microbiologique, en impactant la couleur du vin dans une moindre mesure (faible diminution de la teinte verte uniquement). Seuls les vins traités avec 21.4 J.cm^{-2} et 42.8 J.cm^{-2} présentaient une couleur différenciable à l'œil nu (par un observateur expérimenté ; $2 < \Delta E < 3$) par rapport au vin non traité. Afin d'évaluer l'impact du procédé sur le profil aromatique du vin traité, les teneurs de 15 composés volatils ont été mesurées après traitements avec 10.7 J.cm^{-2} (9 esters, 4 terpènes, 2 acides gras saturés).

Après traitement, les auteurs ont observé une diminution des 15 composés volatils suivis, (dont 13 de manière significative). Dans le vin non traité, l'octanoate d'éthyle ainsi que le décanoate d'éthyle représentaient à eux seuls 70 % de la teneur totale en composés volatils, après traitement, cette contribution a été diminuée de 20 %. Les deux composés pour lesquelles aucune différence significative (limonène et octanoate d'isoamyle) n'a été observée était ceux qui étaient présents avec les teneurs les plus faibles avant traitement ($< 0.1 \text{ mg.L}^{-1}$). Par la suite, l'analyse sensorielle des vins a confirmé la modification de la composition volatile du vin observée suite au traitement par LP. Le panel de dégustateur a révélé une diminution de l'intensité des arômes fruités et floraux (au nez et en bouche) confirmant l'observation faite par chromatographie gazeuse. Les auteurs suspectent que ce phénomène soit lié au dispositif expérimental (traitement par batch dans un photoréacteur ouvert) qui induirait une volatilisation importante des arômes au cours du traitement et qui pourrait donc accentuer l'impact du procédé.

Les résultats obtenus dans les études sur l'impact de la LP sur les qualités organoleptiques des produits traités sont parfois contradictoires. En effet, les différents produits traités, les montages expérimentaux variés (distance lampe/échantillon, la présence ou l'absence d'un système de refroidissement...), les modes de traitement choisis (batch ou continu), les différents types de lampes utilisées (spectres variables) ainsi que les fluences appliquées aux produits rendent le travail de conclusion complexe concernant la caractérisation de l'impact du traitement par LP. Cependant, aux vues des résultats présents dans la littérature, le procédé de LP semble avoir un effet sur la composition phénolique, la couleur et possiblement sur la composition volatile des produits. Il n'existe à l'heure actuelle aucune étude portant sur le traitement de vin rouge par LP ni aucune étude portant sur le traitement de vins en général dans des réacteurs clos et en traitement continu.

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

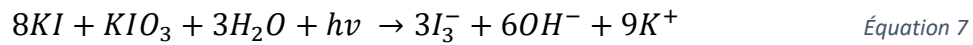
I. Traitements UV-C des différents vins au cours du projet PRISM :

Au cours des trois années du projet PRISM, plusieurs vins ont été traités par rayonnement UV-C. Une première série d'expérimentation réalisée tout au long du projet a eu pour seul but d'évaluer l'impact du procédé sur les propriétés physico-chimiques et sensorielles de 10 matrices variées. Ce travail a été réalisé sur des vins microbiologiquement stables afin de s'affranchir du risque d'apparition de déviations organoleptiques liées au développement de microorganismes d'altération. Le seul objectif était donc d'évaluer si les doses d'UV-C permettant d'assurer la stabilisation microbiologique pouvaient engendrer des modifications organoleptiques des vins. Une seconde expérimentation a été réalisée sur 3,5hl d'un vin rouge en élevage fortement absorbant et présentant des niveaux de population élevés de levures et de bactéries indigènes. L'objectif de ce travail est de (i) de valider l'efficacité du traitement UV-C pour la stabilisation microbiologique d'un vin fortement absorbant et sur des levures indigènes ; (ii) d'évaluer l'impact de différentes doses UV sur les propriétés organoleptiques et enfin (iii) de réaliser un essai de stabilisation microbiologique à échelle semi-industrielle au moyen du pilote de traitement UV-C optimisé tout au long du projet. Les caractéristiques géométriques du pilote industriel ont été réfléchies afin de limiter les pertes de charge tout en permettant un écoulement engendrant des vortex de Dean. Le diamètre du tube, les caractéristiques de l'enroulement, la puissance et le nombre de lampes ont fait l'objet de nombreux essais préliminaires afin de pouvoir traiter des vins avec les exigences des industriels. Les caractéristiques propres de ce pilote ne sont pas discutées dans ce document et gardées confidentielles. Les caractéristiques des vins traités, des différents pilotes utilisés ainsi que des paramètres de traitement choisis pour ces deux essais seront décrits dans cette partie.

I.1. Actinométrie

La dose UV-C appliquée à un liquide circulant dans un module de traitement UV-C a été déterminée par actinométrie chimique iodure/iodate, selon le protocole décrit par Müller et al., (2014). Une solution aqueuse d'iodure de potassium 0,6 M et d'iodate de potassium 0.1 M dans un tampon borate 0.01 M (pH 9.25) a été préparée. Cette solution est optiquement opaque à la lumière pour des longueurs d'ondes inférieures à 290 nm et absorbe l'intégralité des longueurs d'onde germicides.

L'irradiation de la solution à 254nm conduit à la formation linéaire de triiodure, la réaction ayant la stœchiométrie suivante (équation 7) :



Par régression, il est possible de déterminer la dose UV-C absorbée par la solution en fonction de la quantité de triiodure formée. La formation de triiodure peut être suivie en mesurant l'absorbance à 352 nm de la solution. La dose UV-C absorbée par la solution peut ensuite être calculée de la façon suivante (équation 8) :

$$D_v = \frac{A_{352nm} \times P_{253,7nm}}{L \times \phi \times \epsilon_{352nm}} \quad \text{Équation 8}$$

Avec : A_{352nm} l'absorbance mesurée par spectrophotométrie UV, $P_{253,7nm}$ le nombre de joules par Einsteins des photons émis à 253.7 nm (soit $4.716 \cdot 10^5 \text{ J.einst}^{-1}$), ϵ_{352nm} le coefficient d'absorption molaire du triiodure ($27600 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), L la longueur du trajet optique (1 cm) et enfin ϕ le rendement quantique calculé de la façon suivante (équation 9) :

$$\phi = 0.73 \times (1 + 0.23 \times [C_i - 0.577]) \times (1 + 0.02[T_i - 20.7^\circ\text{C}]) \quad \text{Équation 9}$$

avec : C_i la concentration initiale en iodure, mesurée par spectrophotométrie à 300 nm ($A_{300} \text{ nm} \times 1.061^{-1}$) et T_i la température en °C.

Des échantillons de la solution actinométrique ont été prélevés avant (contrôle) et après traitement UV-C. Pour déterminer le rendement quantique (ϕ), C_i la concentration initiale en iodure dans la solution a été calculée à partir d'une mesure de l'absorbance à 300 nm de la solution avant traitement UV-C dans une cuvette en quartz de trajet optique égal à 1cm. Les échantillons ont été mesurés à 352 nm, et la dose UV-C (en J.L^{-1}) délivrée par un passage dans un module UV-C a été calculée comme décrit précédemment (équation 8). Les mesures d'absorbance ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Helios AlphaTM ; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, MA, USA). Toutes les expériences ont été faites en triplicata.

I.2. Étude de l'impact du traitement UV-C sur 10 aux profils variés

I.2.1. Caractéristiques des vins

Afin d'évaluer l'impact du procédé UV-C sur les qualités organoleptiques, 10 vins de cépages différents ont été traités : 6 vins rouges (Cabernet sauvignon, Merlot, Syrah, Grenache, Pinot noir et Malbec), 3 vins blancs (Sauvignon blanc, Gewurztraminer et Chardonnay) ainsi qu'un rosé de Provence. Ces vins ont été sélectionnés pour leurs caractéristiques variées et parce qu'ils représentent une grande partie de la production en France. Cinquante litres de chacun de ces vins ont été obtenus grâce à des partenariats avec l'Institut Français du Vin (IFV), les vignobles Ducourt (Ladaux, France) et le groupe Castel. Les caractéristiques physico-chimiques principales des vins étudiés sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques principales des vins avant traitement UV-C.

	AT (g.L ⁻¹)	AV (g.L ⁻¹)	TAV (%vol)	pH	SO ₂ Libre (mg.L ⁻¹)	SO ₂ Total (mg.L ⁻¹)	Millésime
Sauvignon blanc	4.45	0.23	12.99	3.43	30.4	104	2018
Gewurztraminer	2.01	0.36	13.35	3.38	20.4	119	2019
Chardonnay	3.77	0.30	12.08	4.4	2.6	34	2019
Rosé de Provence	2.57	0.28	12.34	3.46	2	113	2019
Cabernet sauvignon	1.94	0.39	13.46	3.99	32	55	2018
Merlot	3.37	0.28	14.37	3.76	16	38	2018
Syrah	1.95	0.45	14.30	3.77	11	33	2018
Malbec	2.83	0.42	12.99	3.43	14	58	2018
Pinot noir	3.66	0.35	13.1	3.36	12	32	2018
Grenache	2.56	0.43	13.72	3.54	23	45	2018

I.2.2. Caractéristiques du pilote UV-C

Le dispositif de traitement UV-C utilisé pour cet essai de stabilisation microbiologique consistait en 4 modules connectés en série (Figure 25). Chaque module UV-C est constitué d'une lampe à mercure basse pression de 102 W @UV-C (GPHMVA843T10 ; LightSources, China), longue de 78 cm avec un pic de rayonnement maximal à 254 nm. Cette lampe est insérée dans une gaine en quartz (Suzhou Xicheng Water Treatment Equipment, Chine) autour de laquelle un tube en éthylène propylène fluoré (EPF) de qualité alimentaire (Serto SARL, France), de diamètre 8/10 mm (intérieur/extérieur), choisi pour sa haute transmittance UV-C a été enroulé. Le débit de circulation du vin dans l'appareil au cours des traitements est de 200 L.h⁻¹ et la dose appliquée par module est égale à 400 J.L⁻¹ (mesurée par actinométrie), ainsi la circulation du vin dans l'ensemble des 4 modules permet l'application de 1600 J.L⁻¹.

Dans cette essai, des passages successifs nous ont permis de moduler les doses UV-C apportées au vin.

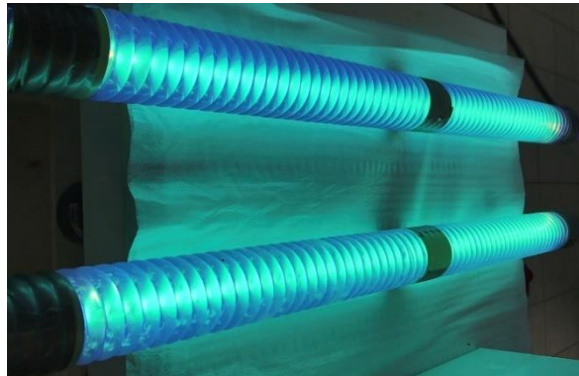


Figure 25 : Photographie de deux modules de traitements UV-C branchés en série

I.2.3. Protocole de traitement UV-C

Les 6 vins rouges (Merlot, Cabernet sauvignon, Syrah, Pinot noir, Malbec et Grenache) ont été traités avec une dose de 6400 J.L^{-1} ce qui correspond à 4 passages consécutifs dans le pilote UV-C. Après chaque passage dans l'appareil, le vin était réceptionné dans un fut préalablement désinfecté à la vapeur et inerté à l'azote afin de limiter les phénomènes d'oxydation et les possibles contaminations microbiologiques. Les 3 vins blancs (Sauvignon blanc, Chardonnay et Gewurztraminer) et le vin rosé ont quant à eux reçu une dose de 1200 J.L^{-1} , ce qui correspond à un seul passage dans l'appareil avec seulement 3 lampes allumées sur les 4. En sortie d'appareil, les vins étaient également réceptionnés dans un fut désinfecté et inerté. Ces doses UV-C ont été sélectionnées vis-à-vis de leur efficacité pour la stabilisation microbologique de chaque matrice. Pour chacun des vins, une modalité contrôle a été réalisée (TOFF) qui correspond à la circulation du vin dans l'appareil de traitement UV-C avec l'ensemble des lampes éteintes. Cette modalité sera notre référence et nous permettra d'évaluer si les UV-C ont un impact sur les vins étudiés.

I.3. Stabilisation microbologique d'un vin rouge par traitement UV-C, impact du traitement sur les caractéristiques physico-chimiques et sensorielles.

Dans cette étude, 350 L d'un vin rouge en élevage (Bordeaux millésimé 2018) ont été utilisés. Ce vin a été sélectionné pour son coefficient d'absorption à 254 nm élevé, sa faible teneur en SO_2 libre et en raison d'une suspicion élevée de présence de levures *B. bruxellensis*.

I.3.1. Traitements UV-C

Le dispositif de traitement UV-C utilisé pour cet essai de stabilisation microbiologique consistait en 16 modules connectés en série (Figure 26). Chaque module UV-C est constitué d'une lampe à mercure basse pression de 102W@UV-C (GPHMVA843T10 ; LightSources, China), longue de 78 cm avec un pic de rayonnement maximal à 254 nm. Cette lampe est insérée dans une gaine en quartz (Suzhou Xicheng Water Treatment Equipment, Chine) autour de laquelle un tube en EPF de qualité alimentaire (Serto SARL, France), de diamètre 8/10 mm (intérieur/extérieur), choisi pour sa haute transmittance UV-C a été enroulé.

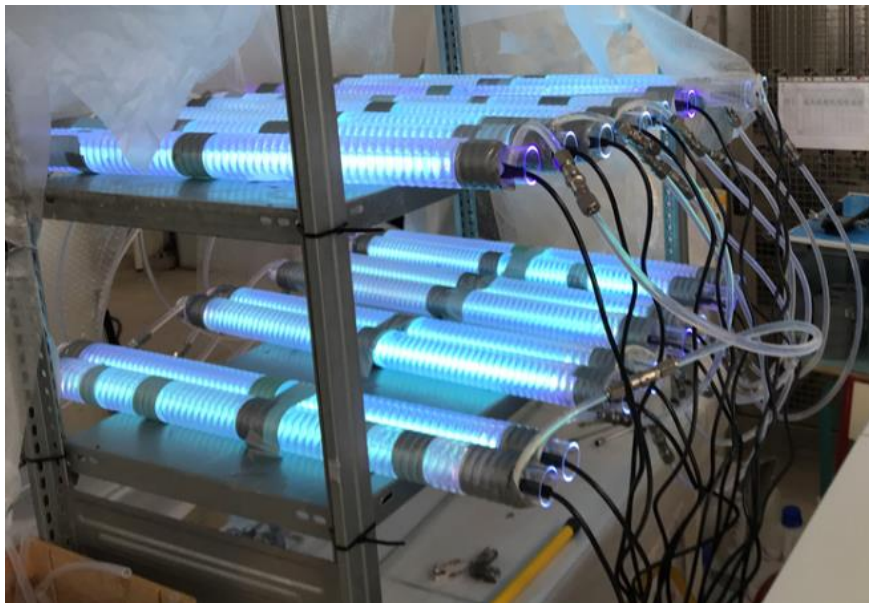


Figure 26 : Photographie du pilote UV-C

Le débit de circulation du vin dans l'appareil était de 200 L.h^{-1} et la dose appliquée par le passage dans un module était de 400 J.L^{-1} (mesurée par actinométrie). Six traitements d'intensités croissantes ont été « appliqués au vin :

- 0 J.L^{-1} vin non traité
- 3200 J.L^{-1} , traitement du vin avec 8 lampes allumées sur les 16
- 4000 J.L^{-1} , traitement du vin avec 10 lampes allumées sur les 16
- 4800 J.L^{-1} , traitement du vin avec 12 lampes allumées sur les 16
- 5600 J.L^{-1} , traitement du vin avec 14 lampes allumées sur les 16
- 6400 J.L^{-1} , traitement du vin avec 16 lampes allumées sur les 16

Les débits et les températures ont été systématiquement mesurés pour s'affranchir de tout artefact lié à un temps de séjour trop long ou un réchauffement anormal pendant le traitement. Après les traitements, chaque modalité a été stockée dans des fûts inertés de 20 L et conservées à 12 °C jusqu'à leur mise en bouteille.

I.3.2. Suivi microbiologique des vins

Dans cet essai, le suivi microbiologique des vins avant et après traitements UV-C a été réalisé par dénombrement sur milieux gélosés afin de suivre l'évolution des populations de levures et de bactéries totales. Un dénombrement initial a été réalisé avant traitement UV-C pour confirmer la présence dans le vin de populations indigènes de levures et de bactéries. Trois autres dénombrements ont été réalisés ; juste après traitement et après 1 et 3 mois de conservation. Des dilutions successives de facteur 10 ont été réalisées pour chaque échantillons et 100 µL de chacune de ces dilutions ont été étalés sur boîte de Petri. Les levures totales ont été dénombrées sur milieu Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) (extrait de levure 10 g.L⁻¹, peptone 10 g.L⁻¹, glucose 20 g.L⁻¹, agar 20 g.L⁻¹, chloramphénicol 0,1 mg.mL⁻¹, biphényle 0,15 mg.mL⁻¹) après 7 jours d'incubation à 27 °C. Les bactéries totales ont été dénombrées sur milieu « Jus de raisin » (jus de raisin commercial 250 mL.L⁻¹, Tween 80 1 mL, extrait de levures 5 g.L⁻¹, pimarcine 0.1 mg.mL⁻¹; biphényle 0.15 mg.mL⁻¹) après 10 jours d'incubation à 25 °C. Le nombre de colonies comptées était exprimé en UFC.mL⁻¹ et la limite de détection était de 1 UFC.mL⁻¹.

II. Analyses physico-chimiques et sensorielles de vins

II.1. Paramètres standards du vin

Le SO₂ libre et total, le pH, l'acidité totale et l'acidité volatile ont été mesurés à l'aide de l'analyseur automatique enzymatique Y15 (Biosystems S.A, Barcelone, Espagne). Le titre alcoométrique volumétrique a été mesuré à l'aide d'un analyseur WineScan (FOSS).

II.2. Détermination du coefficient d'absorbance à 254nm

Le coefficient d'absorption du vin (α en cm⁻¹) à $\lambda = 254$ nm a été déterminé préalablement au traitement UV-C afin de déterminer le niveau d'absorbance du vin. Ce coefficient correspond à la pente de la droite définie par la valeur de l'absorbance à 254 nm du vin en fonction de la longueur du trajet optique (en cm). Cette droite est obtenue en mesurant l'absorbance à 254

nm du vin (dilué au cinquantième) dans des cuvettes en quartz d'épaisseurs croissantes (1, 5 et 10 mm) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Helios AlphaTM ; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, MA, USA).

II.3. Analyse de la couleur

II.3.1. Mesures des paramètres chromatiques du vin par spectrophotométrie

Les absorbances du vin à 420, 520 et 620 nm ont été mesurées dans une cuvette en quartz de trajet optique égal à 1 mm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Helios AlphaTM Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, MA, USA).

II.3.2. Colorimétrie – Espace CIELAB

La clarté (L^*) ainsi que les composantes de couleur vert-rouge (a^*) et jaune-bleu (b^*) (Figure 27) ont été calculées à l'aide du logiciel MSCV (www.unirioja.es/color/descargas.shtml). Ce logiciel permet le calcul des paramètres L^* , a^* et b^* à partir de la mesure des absorbances du vin à 450, 520, 570 et 630 nm.

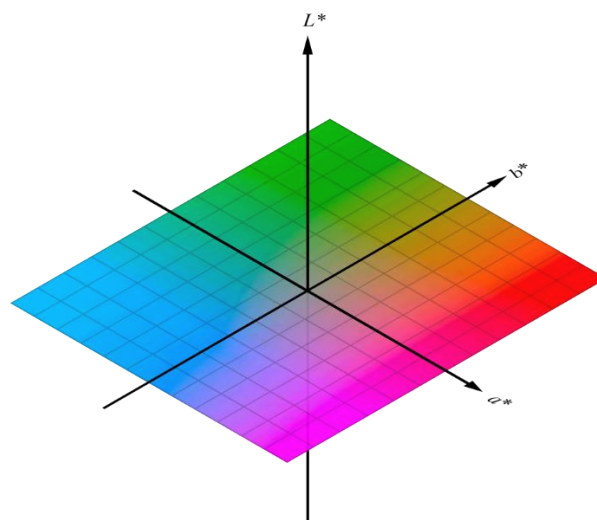


Figure 27 Espace colorimétrique CIELAB

Les valeurs d'absorbance ont été mesurées dans une cuvette en quartz de 1mm de trajet optique, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Helios AlphaTM Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, MA, USA). Le paramètre ΔE a également été calculé à partir des valeurs des paramètres L^* , a^* et b^* de la manière suivante (équation 10):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L *)^2 + (\Delta a *)^2 + (\Delta b *)^2} \quad \text{Équation 10}$$

Une valeur de ΔE supérieure à 3 indique une différence de couleur perceptible à l'œil nu entre deux vins (Martinez et al., 2001).

II.4. Étude de la composition phénolique par HPLC

II.4.1. Monomères et oligomères de tanins moléculaires

Les vins préalablement filtrés (0.45 μm) sont directement injectés pour les analyses HPLC. L'équipement utilisé pour l'analyse HPLC était composé d'un détecteur UV-Visible Thermo-Finnigan (UV-vis 200), d'un échantillonneur automatique Thermo-Finnigan et d'une pompe à gradient ternaire Thermo-Finnigan (San Jose, CA, USA) couplée au logiciel de traitement de données Xcalibur. La séparation a été réalisée sur une colonne en phase inverse Lichrosphere 100-RP18 (250 mm x 2 mm, 5 μm ; Merck, France) selon González-Centeno et al. (2012). Les phases mobiles sont les suivantes :

- Solvant A : eau acidifiée avec de l'acide formique à 0.5 %.
- Solvant B : acétonitrile acidifié avec de l'acide formique à 0.5 %.

Le débit des phases mobiles dans la colonne est de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ avec le gradient suivant de solvant B : 3 % pendant 3 min, de 3 à 5 % pendant 11 min, de 5 à 10 % B pendant 8 min, de 10 à 14 % pendant 4 min, de 14 à 25 % pendant 14 min, de 25 à 100 % pendant 1 min, 100 % pendant 7 min, de 100 % à 3 % B pendant 2 min et enfin 3 % pendant 5 min. Le suivi des pics d'éluion est réalisé par un détecteur UV à 280 nm et un détecteur à fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 320 \text{ nm}$). L'identification des pics est réalisée par comparaison avec des résultats obtenus précédemment suite à l'injection de standards externes des différents composés quantifiés (Chira, 2009). Des courbes d'étalonnage ont été établies en utilisant la catéchine comme étalon externe et les concentrations sont exprimées en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ équivalents catéchine.

II.4.2. Anthocyanes moléculaires

Les vins préalablement filtrés (0.45 μm) sont directement injectés pour les analyses HPLC. Les analyses HPLC-UV ont été effectuées selon les paramètres décrits par González-Centeno et al. (2017) au moyen d'un appareil Thermo Scientific Accela (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) qui inclut un module de pompe Accela 600 ainsi qu'un détecteur UV-Vis à barrette

de diodes. Le traitement des données est réalisé à l'aide du logiciel Xcalibur. La séparation est réalisée sur une colonne en phase inverse Nucleosil C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm). Les phases mobiles sont les suivantes :

- Solvant A : eau et acide formique (95:5, v/v)
- Solvant B : acétonitrile et acide formique (95:5, v/v)

Le débit des phases mobiles dans la colonne est de 1 mL.min⁻¹ avec le gradient suivant de solvant B : augmentation de 10 % à 35 % en 25 minutes, augmentation de 35 % à 100 % en 10 minutes, 100 % pendant 5 minutes, diminution de 100 % à 10 % en une minute puis retour à 10 % pour l'injection suivante. Le suivi des pics d'élution est réalisé par un détecteur UV à 520 nm. L'identification des pics est réalisée par comparaison avec des résultats obtenus précédemment suite à l'injection de standards externes des différents composés quantifiés (Chira, 2009). Des courbes d'étalonnage ont été établies en utilisant la malvidine 3-O-glucoside comme étalon externe et les concentrations sont exprimées en mg.L⁻¹ équivalent malvidine 3-O-glucoside.

II.5. Étude de la composition volatile par GC-MS

II.5.1. Dosage des esters par HS-SPME/GC-MS

10mL de vin ont été introduits dans un vial pour SPME (Solid Phase Micro Extraction) préalablement rempli avec 3.5 g de NaCl. Le vin a été additionné avec 10 µL d'un mélange d'étalons internes deutérés (4,4,4-butanoate d'éthyle-d3 à 178 mg.L⁻¹, hexanoate d'éthyle-d11 à 209 mg.L⁻¹, octanoate d'éthyle-d15 à 223 mg.L⁻¹ et trans-cinnamate d'éthyle-d5 à 325 mg.L⁻¹ dans de l'éthanol). Après ajout du mélange d'étalons internes deutérés, le flacon a été serti avec une capsule munie d'un septum en téflon double face. L'adsorption a été réalisée avec une fibre de PDMS (épaisseur de film de 100 µm ; longueur de 1 cm) à 40 °C pendant 30 minutes avec une vitesse d'agitation de 500 rpm. La désorption a été réalisée pendant 15 minutes en mode split/splitless (15 s) avec la température de l'injecteur réglée à 250 °C. La colonne utilisée est une BP21 (SGE ; 30 m x 0.32 mm x 0.25 µm). Le chromatographe utilisé est un Agilent 6890N (Agilent technologies, Massy, France) équipé d'un passeur d'échantillons automatique Gerstel MPS2. Le gradient de température était le suivant : 40 °C pendant 5 minutes, puis 5 °C par minute jusqu'à 220 °C et enfin 220 °C maintenu pendant 30 minutes. Le gaz vecteur était de l'hélium à un débit de 1.2 mL.min⁻¹. Ce dispositif a été couplé à un

spectromètre de masse 5975C (Agilent technologies, Massy, France) fonctionnant en impact électronique (70 eV) à une température de 280 °C. La détection des différents esters a été faite en mode SIM.

II.5.2. Méthode de dosage par GC-FID

Cette analyse est réalisée par injection directe de 0.5 µL d'un mélange de 5 mL de vin additionné de 50 µL de la solution d'étalon interne (4-méthylpentan-2-ol à 10 g.L⁻¹ en solution hydro alcoolique). La température de l'injecteur est de 200 °C (injection split, rapport de division 1/60). L'appareil utilisé est une chromatographe Agilent 6890N équipé d'une colonne Agilent CPWAX 57 CB (50 m x 0.25 mm ; 0.2 µm d'épaisseur de film, Agilent). Le gaz vecteur est de l'hydrogène (5.5) à un débit de 2 mL.min⁻¹. Le détecteur utilisé est un détecteur à ionisation de flamme (FID), paramétré à 240 °C. La méthode permet le dosage du méthanol, de l'acétate d'éthyle, de l'éthanal et des alcools supérieurs suivants le propan-1-ol, le 2-méthylpropanol, le butan-1-ol et les alcools isoamyliques.

II.5.3. Dosage des thiols volatils, de marqueurs d'oxydations, de lactones et de composés C13-norisoprénoides par SPE/GCMS

Les thiols volatils (3SH, 3SHA, E2SA et 4MSP), les lactones (massoia lactone, γ-octalactone, γ-nonolactone, γ-décalactone et δ-décalactone), les marqueurs d'oxydation et vieillissement prématuré (méthional, phénylacétaldéhyde et 2-aminoacétophénone) ainsi que les composés C13-norisoprénoides (β-damascénone et β-ionone) ont été quantifiés dans les vins à l'aide de la méthode suivante.

20 mL d'échantillon de vin ont été additionnés de 10 µL de 6-sulfanyl-hexanol (6SH, 30 µmol.L⁻¹, EtOH), de 4-méthoxy-2-méthyle-2-sulfanylbutane (MMSB, 30 µmol.L⁻¹, EtOH), et 20 µL de 3-octanol (1 mg.L⁻¹, EtOH), de l'éthyle maltol (1 mg.L⁻¹, EtOH) comme étalons internes ainsi que de 10µL d'EDTA (30 mg.L⁻¹, eau). Les vins ont été extraits sur une phase solide composée d'un polymère hydrophobe de polystyrène-divinylbenzène (Chromabond HR-X). Les composés volatils ont été élués une première fois à l'aide 3 mL d'un mélange de pentane et de dichlorométhane (50/50, v/v) et puis une seconde fois avec 3 mL d'un mélange composé de dichlorométhane et de méthanol (95/5, v/v). Les phases organiques ont été récupérées, mélangées puis concentrées sous flux d'azote jusqu'à l'obtention d'un volume proche de 150 µL.

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Trace GC Ultra (Thermo Electron SAS, Courtaboeuf, France) couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle TSQ Quantum XLS. La séparation GC a été réalisée sur une colonne capillaire de cire polaire (polyéthylène glycol, 50 m ; 0.25 mm ; 1 μ m) de Phenomenex (Le Pecq, France). Le gaz vecteur était de l'hélium (Linde gas, Saint-Priest, France), grade 5.3, avec un débit de 1 mL.min⁻¹. Un volume de 1 μ L d'échantillon a été injecté via l'autosampler (auto-sampler Triplus RSH) dans un injecteur à température programmable en mode split/splitless (temps de fermeture 1 min, débit fractionné 30 mL.min⁻¹) programmé de la manière suivante : 200 °C pendant 1 min puis 14 °C.min⁻¹ jusqu'à 250 °C et enfin 250 °C pendant 10 min. La température du four a été initialement fixée à 45 °C, cette température est maintenue pendant 1 min, augmentée jusqu'à 250 °C avec un gradient de 4 °C.min⁻¹, portée ensuite à 260 °C à une vitesse de 50 °C.min⁻¹ et finalement maintenue à cette température pendant 10 minutes. La température de la ligne de transfert MS a été fixée à 260 °C. Les paramètres de la source, y compris la température de la source, l'énergie des électrons, le courant d'émission et la lentille électronique ont été réglés respectivement à 230 °C, 25 eV, 50 μ A et 100 V. Le gaz de collision était de l'argon.

II.6. Analyse statistique

Des analyses ANOVA (seuil de 5 %) sont réalisées pour mettre en évidence la significativité des résultats obtenus. Un test post-hoc de Tukey (seuil de 5 %) est utilisé pour discriminer les groupes différents lorsque les résultats de l'ANOVA se sont avérés significatifs.

II.7. Analyse sensorielle

Des séances d'analyses sensorielles ont été réalisées afin de révéler d'éventuelles différences entre les vins traités aux UV-C et les vins n'ayant reçu aucun traitement. Les échantillons ont été évalués dans une salle à température ambiante contrôlée (20 °C), dans des cabines individuelles, à l'aide de verres de dégustation ISO contenant environ 25 mL de liquide et numérotés avec des nombres aléatoires à trois chiffres. Les panélistes sélectionnés pour leur disponibilité, leur niveau de formation et leur intérêt étaient des personnels du laboratoire de recherche de l'Institut des sciences de la vigne et du vin de l'Université de Bordeaux. Ces séances ont été réalisées sous forme de tests triangulaires. Pour chaque test triangulaire, trois échantillons numérotés au hasard ont été présentés dans un ordre aléatoire : deux identiques

et un différent. Chaque juge pouvait utiliser la perception visuelle, olfactive et gustative directe pour identifier l'échantillon perçu comme différent dans chaque test et devait donner une réponse, même en cas d'incertitude. Les résultats de l'ensemble des tests triangulaires ont ensuite été analysés statistiquement selon la norme NF EN ISO 4120:2007, sur la base de la loi binomiale correspondant à la répartition des réponses dans ce type de test.

III. Étude des variabilités intra et interspécifiques de levures vis-à-vis de leur sensibilité au rayonnement UV-C et à la LP sur milieu solide et dans le vin.

III.1. Screening large sur milieu solide

Deux études indépendantes l'une de l'autre ont été réalisées afin d'évaluer le niveau de variabilité vis-à-vis de la sensibilité au rayonnement (i) UV-C dans un premier temps puis (ii) à la lumière pulsée. Ces deux expérimentations partagent une approche expérimentale commune concernant le screening rapide des niveaux de sensibilité de levures fréquemment identifiées en œnologie sur milieu solide. C'est pourquoi les détails de leur mise en place seront décrits conjointement dans cette partie.

III.1.1. Souches de levures sélectionnées

Afin d'évaluer les niveaux de sensibilités au rayonnement UV-C ainsi qu'à la LP, plus d'une centaine de souches appartenant à 14 espèces de levures fréquemment identifiées dans l'environnement viti-vinicole ont été sélectionnées et leurs cinétiques de croissance après traitements ont été comparées. Ces souches provenaient principalement de la collection du CRB Œnologie (Centre de Ressources Biologiques Œnologie, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, France) mais aussi d'autres laboratoires ou collections. Les souches sélectionnées pour l'étude de la sensibilité au rayonnement UV-C (147 souches) sont présentées dans le Tableau 5, celles utilisées pour l'étude de la sensibilité à la LP (198 souches) sont présentées dans le Tableau 6.

Tableau 5 : Espèces et souches de levures sélectionnées pour l'étude de la variabilité intra et interspécifique vis-à-vis de la sensibilité au rayonnement UV-C.

Espèces	Nombre et ID des souches
<i>B. anomalus</i>	3 souches : BR 23-4 ; CLIB 304 ; NRRL Y-17522 T
<i>B. bruxellensis</i>	1st Wine 3N - 22 souches : 2OT13_02 ; 33_2 ; AWRI1499 ; GB12 ; GSP1509 ; CRBO L0417 ; CRBO L14155 ; CRBO L14174 ; CRBO L14175 ; CRBO L14194 ; CRBO L1703 ; CRBO L17111 ; CRBO L1727 ; YJS5408 ; YJS5434 ; YJS5445 ; YJS5459 ; YJS5469 ; YJS5473 ; YJS5476 ; YJS5478 ; YJS5487 Wine/Kombucha 2N - 19 souches : 15_1 ; ISA1601 ; YJS5301 ; YJS5310 ; YJS5334 ; YJS5340 ; YJS5344 ; YJS5349 ; YJS5363 ; YJS5368 ; YJS5384 ; YJS5398 ; YJS5402 ; YJS5406 ; YJS5407 ; YJS5413 ; YJS5417 ; YJS5420 ; YJS5431 Wine 2N - 30 souches : 1961_MX_M1_E2 ; CBS 2499 ; ISA2150 ; CRBO L0469 ; CRBO L0614 ; CRBO L14163 ; CRBO L1714 ; CRBO L1751 ; YJS5302 ; YJS5319 ; YJS5320 ; YJS5345 ; YJS5347ww ; YJS5357 ; YJS5373 ; YJS5385 ; YJS5392 ; YJS5416 ; YJS5422 ; YJS5426 ; YJS5440 ; YJS5447 ; YJS5449 ; YJS5453 ; YJS5456 ; YJS5458 ; YJS5461 ; YJS5463 ; YJS5479 ; YJS5485 Wine/Beer 3N - 21 souches : 2OT13_05 ; 2OT13_07 ; 2OT14_01 ; 2OT14_03 ; AWRI1608 ; CDR222 ; GB62 ; ISA2397 ; CRBO L17112 ; CRBO L1741 ; CRBO L1749 ; CRBO L1771 ; LB15107g ; LB15110g ; NL045 ; NL059 ; VP1519 ; YJS5396 ; YJS5397 ; YJS5400 ; YJS5454 Tequila/bioéthanol 3N - 5 souches : CRBO L14169 ; CRBO L17108 ; CRBO L1715 ; SJ12_4 ; UWOPS_92__298_4 2nd Wine 3N - 7 souches : ISA2211 ; CRBO L0308 ; CRBO L1733 ; CRBO L1782 ; VP1539 ; VP1544 ; YJS5382
<i>H. uvarum</i>	3 souches : L1433 ; NZ15 ; Y-1614
<i>L. thermotolerans</i>	3 souches : 18 ; AEB ; CLIB292
<i>M. pulcherrima</i>	3 souches : L0675 ; NZ268 ; Y-7111
<i>S. cerevisiae</i>	10 souches : A24 ; Fx 10 ; GN ; CRBO L0431 ; CRBO L0432 ; CRBO L0433 ; CRBO L0437 ; SB ; X5 ; Y7327
<i>S. uvarum</i>	2 souches : U1 ; U3
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. uvarum</i>	2 souches : DU23 ; EU23
<i>Schizo. Pombe</i>	3 souches : CRBO L0442 ; Y-11791 ; Y-12796
<i>Starm. bacillaris</i>	3 souches : 10_372 ; CRBO L0473 ; NZ12
<i>T. delbrueckii</i>	3 souches : B172 ; CLIB 230 ; CRBO L0705
<i>Tri. cantarellii</i>	3 souches : CRBO L0412 ; CRBO L0416 ; CRBO L0419
<i>Zygo. Bailii</i>	3 souches : CLIB 213 ; CRBO L0446 ; CRBO L0536
<i>Zygo. rouxii</i>	2 souches : CLIB 233 ; CRBO L0314

Tableau 6 : Espèces et souches de levures sélectionnées pour l'étude de la variabilité intra et interspécifique vis-à-vis de la sensibilité à la LP.

Espèces	Nombre et ID des souches
<i>B. anomalus</i>	3 souches : BR 23-4 ; CLIB 304 ; NRRL Y-17522 T
<i>B. bruxellensis</i>	Wine 2N - 34 souches : 1961_MX_M1_E2 ; CBS 2499 ; ISA2150 ; CRBO L0469 ; CRBO L0614 ; CRBO L14163 ; CRBO L1703 ; CRBO L17111 ; CRBO L1714 ; CRBO L1715 ; CRBO L1727 ; CRBO L1751 ; YJS5302 ; YJS5319 ; YJS5320 ; YJS5345 ; YJS5347 ; YJS5357 ; YJS5373 ; YJS5385 ; YJS5392 ; YJS5416 ; YJS5422 ; YJS5426 ; YJS5440 ; YJS5447 ; YJS5449 ; YJS5453 ; YJS5456 ; YJS5458 ; YJS5461 ; YJS5463 ; YJS5479 ; YJS5485 Wine/Kombucha 2N - 19 souches : 15_1 ; ISA1601 ; YJS5301 ; YJS5310 ; YJS5334 ; YJS5340 ; YJS5344 ; YJS5349 ; YJS5363 ; YJS5368 ; YJS5384 ; YJS5398 ; YJS5402 ; YJS5406 ; YJS5407 ; YJS5413 ; YJS5417 ; YJS5420 ; YJS5431 Wine/Beer 3N - 25 souches : 2OT13_05 ; 2OT13_07 ; 2OT14_01 ; 2OT14_03 ; AWRI1608 ; CDR222 ; GB62 ; ISA2397 ; CRBO L0417 ; CRBO L14155 ; CRBO L14194 ; CRBO L17112 ; CRBO L1741 ; CRBO L1749 ; CRBO L1771 ; LB15107g ; LB15110g ; MLC_296_2014_9 ; NL045 ; NL059 ; VP1519 ; YJS5396 ; YJS5397 ; YJS5400 ; YJS5454 1st Wine 3N - 19 souches : 12_LT_VGC3_c_10 ; 2OT13_02 ; 33_2 ; AWRI1499 ; CDR217 ; GB12 ; GSP1509 ; CRBO L14174 ; CRBO L14175 ; NL050 ; YJS5408 ; YJS5434 ; YJS5445 ; YJS5459 ; YJS5469 ; YJS5473 ; YJS5476 ; YJS5478 ; YJS5487

	Tequila/bioéthanol 3N - 6 souches: CBS 5512; CBS 6055; CRBO L14169; CRBO L17108; SJ12_4; UWOPS_92__298_4 2nd Wine 3N - 8 souches: ISA2211; CRBO L0308; CRBO L14190; CRBO L1733; CRBO L1782; VP1539; VP1544; YJS5382
<i>H. uvarum</i>	3 souches: CRBO L1433 ; NZ15 ; Y-1614
<i>L. thermotolerans</i>	3 souches: 18; AEB; CLIB292
<i>M. pulcherrima</i>	3 souches: CRBO L0675 ; NZ268 ; Y-7111
<i>S. cerevisiae</i>	Beer - 10 souches: 227; 382; 650; Nottingham; premium gold; S-04; US-56; Windsor; Y7327; Y7328 Bread - 10 souches: 215; 319; 324; 646; Hironnelle; SBA; SBB; SBC; SBD; SBE Dist - 5 souches: A24 ; alcotec 48 ; Y-963 ; YB-427 ; YB-428 Food - 2 souches: Y-767 ; YB-360 Fruit - 5 souches: Y-6678 ; Y-7568 ; Y-965 ; YB-210 ; YB-4081 Fruit juice - 4 souches: Y-129 ; Y-2230 ; Y-6275 ; Y-6278 Nature - 2 souches: Y-35 ; Y-7567 Wine - 13 souches: 154 ; 157 ; 328 ; 479 ; Fx 10 ; GN ; CRBO L0431 ; CRBO L0432 ; CRBO L0433 ; CRBO L0437 ; SB ; X5 ; Y-1301
<i>S. uvarum</i>	2 souches: U1; U3
<i>Sc x Su</i>	2 souches: DU23; EU23
<i>Schizo. pombe</i>	3 souches: CRBO L0442 ; Y-11791 ; Y-12796
<i>Starm. bacillaris</i>	3 souches: 10_372; CRBO L0473; NZ12
<i>T. delbrueckii</i>	3 souches: B172 ; CLIB 230 ; CRBO L0705
<i>Tri. cantarellii</i>	3 souches: CRBO L0412 ; CRBO L0416 ; CRBO L0419
<i>Zygo. bailii</i>	2 souches: CLIB 213; CRBO L0536
<i>Zygo. rouxii</i>	2 souches: CLIB 233; CRBO L0314

III.1.2. Traitement UV-C sur milieu solide

Le protocole suivant a été mis au point afin d'évaluer les niveaux relatifs de sensibilité aux UV-C de 147 souches appartenant à 14 espèces de levures identifiées dans l'environnement vitivinicole. Le niveau de sensibilité aux UV-C de chacune des souches a été évalué en étudiant leur cinétique de croissance sur milieu YPD solide suite à leur exposition à des intensités croissantes de rayonnement. Les différentes souches ont été cultivées seules en milieu liquide YPD (extrait de levures 10 g.L⁻¹, 10 g.L⁻¹ peptone, 20 g.L⁻¹ glucose). Le suivi des niveaux de population des levures a été réalisé par mesures régulières de la densité optique à 600nm des milieux de culture (FLUOstar Omega, MNGLabtech, France). Une fois que les niveaux de population étaient suffisants, des dilutions en série du milieu de culture initial ont été réalisées afin d'obtenir des niveaux de population proches de 10⁶, 10⁵ et 10⁴ UFC.mL⁻¹. Par la suite, pour chacune des souches, trois gouttes de 2 µL de chacune de ces dilutions ont été déposées sur milieu YPD solide (boîte de Petri) correspondant à des densités de l'ordre de 10³, 10² et 10¹ UFC/goutte. Sur chacune des boîtes de Petri, 99 gouttes étaient déposées, correspondant à 3 densités de population pour 33 souches (Figure 28). Pour évaluer la réponse des 147 souches à une modalité de traitement UV-C en triplicata, 15 boîtes de Petri ont donc été préparées.

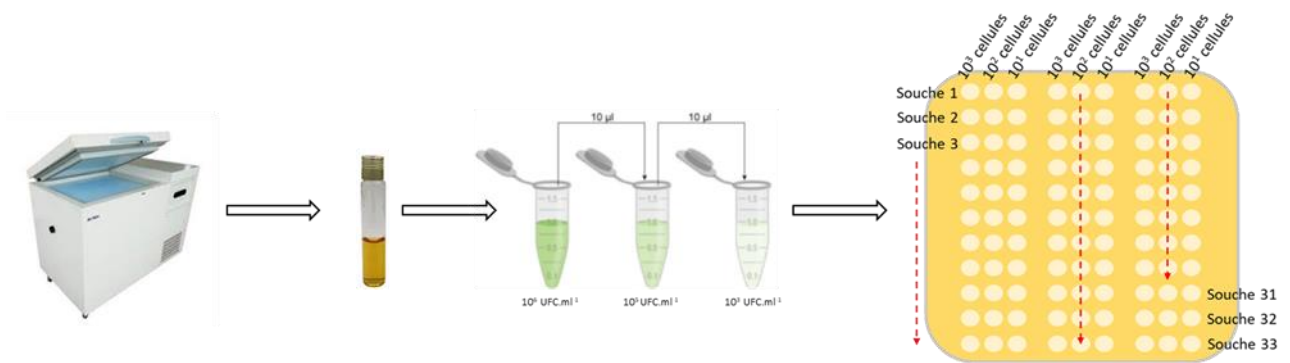


Figure 28 : Protocole de sortie de collection et d'inoculation sur boîte de Petri préalablement aux traitements UV-C.

Au total, 6 traitements UV-C différents ont été appliqués à l'ensemble des souches ce qui porte le nombre de boîtes de Petri inoculées à 90. Une fois les gouttes déposées sur les boîtes de Petri, celles-ci ont été exposées à 6 fluences différentes : 0 (control), 2000, 4000, 6000, 7500 et 10 000 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Pour réaliser ces traitements, les boîtes de Petri inoculées ont été placées 15 cm en dessous de deux lampes à mercure basse pression de 43 W @UV-C (GPHA843T6, LightSources, China) dans un dispositif conçu spécialement. Les fluences UV-C appliquées ont été suivies (en $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$) à l'aide d'un capteur UV-C placé au niveau des boîtes de Petri (HD2102.2 avec sonde UV-C LP 471 ; DeltaOHM, Italie). Les différentes modalités de traitement ont été appliquées en faisant varier les temps d'exposition au rayonnement.

III.1.3. Traitement par LP sur milieu solide

Le protocole suivant a été mis au point afin d'évaluer rapidement les niveaux relatifs de sensibilité à la LP de 198 souches appartenant à 14 espèces de levures. Le niveau de sensibilité au traitement par LP de chacune des souches a été évalué en étudiant leur cinétique de croissance sur milieu YPD solide suite à leur exposition à différentes intensités de traitement. L'importance des différents paramètres de traitement que sont la fluence totale, la fluence par flash ainsi que de la fréquence de traitement a également été évaluée. Dans un premier temps, les souches ont été cultivées en milieu YPD liquide (extrait de levure 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, peptone 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, glucose 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et le suivi de croissance a été réalisé par mesure de la densité optique à 600 nm (FLUOstar Omega, MNGLabtech, France). Une fois que les niveaux de population étaient suffisants, pour chaque souche étudiée, des dilutions en série du milieu de culture initial ont été réalisées pour obtenir des niveaux de population proches de 10^6 , 10^5 , 10^4 et 10^3 $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. Par la suite, pour chacune des souches, trois gouttes de 2 μL de chacune de ces

dilutions ont été déposées sur milieu YPD solide (boite de Petri) correspondant à des densités de l'ordre de 10^3 , 10^2 , 10 et 1 UFC/goutte (Figure 29).

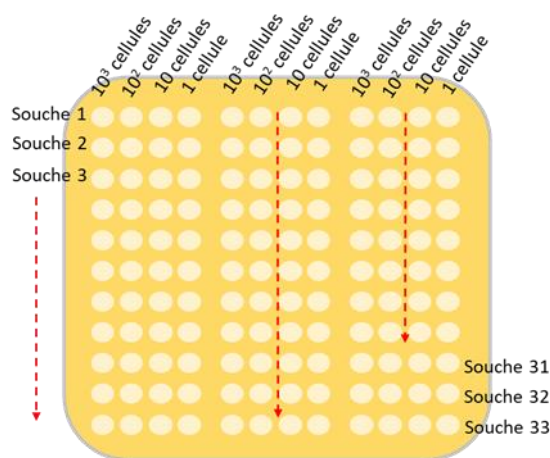


Figure 29 Schémas d'inoculation des souches sur boîte de Petri préalablement au traitements par LP

Pour évaluer l'impact d'une modalité de traitement par LP sur l'ensemble des souches, 6 boîtes de Petri étaient nécessaires. Au total, 15 modalités de traitement différentes ont été appliquées aux souches étudiées et l'ensemble des traitements a été réalisé en triplicata ce qui porte le nombre de boîtes de Petri préparées à 270. Les 15 modalités de traitement appliquées ont été choisies afin de pouvoir évaluer les niveaux de sensibilité des différentes souches (Tableau 7) sélectionnées ainsi que l'influence des différents paramètres de traitement suivants : La fluence par flash, la fluence totale et la fréquence des flashes.

Modalité	Fluence/Flash (mJ.cm ⁻²)	Nombre de flash	Fréquence (Hz)	Fluence totale (mJ.cm ⁻²)
1	0	0	0	0
2	22	20	5	440
3	22	20	2	440
4	22	20	1	440
5	42	2	2	84
6	42	5	2	210
7	42	10	5	420
8	42	10	2	420
9	42	10	1	420
10	42	15	2	630
11	42	20	2	840
12	42	25	2	1050
13	87	5	5	435
14	87	5	2	435
15	87	5	1	435

Tableau 7 : Modalité de traitement par LP des différentes souches de levures inoculées sur boîte de Petri

Les modalités 1,5,6,8,10,11 et 12 ont été sélectionnées pour étudier l'impact d'une fluence totale croissante (respectivement 0, 84, 210, 420, 630, 840 et 1050 mJ.cm⁻²) sur les cinétiques de croissance suite aux traitements des différentes souches étudiées. Seul le nombre de flash

appliqués varie entre ces modalités, la fréquence de flash et la fluence par flash ont été fixées respectivement paramétrées à 2 Hz et 42 mJ.cm⁻². Les modalités restantes (2,3,4,7,8,9,13,14 et 15) ont été choisies afin d'évaluer l'impact de la fluence par flash et de la fréquence des flashes. Ces modalités correspondent toutes à un traitement avec une fluence totale équivalente (entre 420 et 440 mJ.cm⁻²), cependant, la manière dont cette fluence totale est distribuée varie entre ces modalités. Trois valeurs de fluence par flash (22, 42 et 87 mJ.cm⁻²) et trois valeurs de fréquence de traitement (1, 2 et 5 Hz) ont été sélectionnées et les modalités 2, 3, 4, 7, 8, 9, 13, 14, et 15 correspondent aux différentes combinaisons possibles. Les fluences totales pour l'ensemble des modalités de traitement correspondent au nombre de flashes appliqués multiplié par la fluence par flash (mJ.cm⁻²). Les valeurs de fluence par flash correspondent aux valeurs mesurées 30 cm directement sous la lampe. Les traitements ont été réalisés en plaçant les boîtes de Petri fraîchement inoculées dans l'enceinte d'une LP.Box (Sanodev, France)(Figure 30) et chaque traitement a été réalisé en triplicata pour chacune des souches.



Figure 30 : Dispositif de traitement par LP (LP.Box , Sanodev, France)

Les boîtes de Petri étaient placées 30 cm en dessous d'une lampe à xénon (450 tor ; longueur 20 cm ; FlashLamps, France). Le dispositif dispose d'une interface sur laquelle le nombre de flash, la fréquence de traitement ainsi la tension de la lampe (conditionne la fluence par flash) peuvent être paramétrés.

III.1.4. Suivi de croissance sur milieu gélosé après traitements UV-C et LP

Le protocole de suivi de croissance après traitement est commun aux deux études (UV-C et LP). Après traitement, les boîtes de Petri ont été incubées dans l'obscurité pendant 10 jours à 24 °C. Chaque jour pendant la durée d'incubation, les boîtes de Petri ont été photographiées une par une sur un panneau rétro-éclairant (modèle DMC-FS7, Panasonic Corporation, Japon) afin de réaliser un suivi de croissance. Les photographies obtenues ont par la suite été traitées numériquement à l'aide d'un pipeline d'analyse développé avec le logiciel R (R Development Core Team, 2013). Brièvement, dans un premier temps, les photographies ont été importées dans le logiciel R à l'aide du package *OpenImageR*. Chaque photographie a été recadrée (pour que les tailles des gouttes soient comparables) et l'emplacement de chaque goutte déposée a été défini manuellement à l'aide de la fonction *grid.locator* (package *grid*).

Pour les photographies des boîtes traitées par UV-C, la surface de chaque goutte a été calculée automatiquement (en pixel) après élimination du bruit de fond. Pour chaque combinaison de souche et de traitement (147 souches * 6 modalités de traitement = 882 combinaisons), une courbe de croissance correspondant à la surface de goutte (en pixel) en fonction du temps d'incubation a ainsi été obtenue. Pour chaque traitement et souche, les cinétiques de croissance ont été ajustées à l'aide d'une distribution log-logistique à trois paramètres (Figure 31 B, E, H, K). Afin d'analyser et de normaliser l'ensemble de données obtenues, les cinétiques de croissance ont été exprimées en AUC (Aires sous la courbe ; « Area Under Curve » en anglais) (Figure 31 C, F, I, L). Ce paramètre unique permet d'intégrer les variations des phases de latence, des phases exponentielles et des phases stationnaires. Les AUC ont été calculées puis normalisées par rapport aux AUC obtenues à partir des cinétiques de croissances sans traitement UV-C. À noter que d'autres paramètres permettant de caractériser la croissance (taille maximale de la population, phase de latence) ont été calculés et ont donné des résultats similaires au paramètre retenu pour l'analyse (AUC normalisée). L'analyse statistique du paramètre AUC a été réalisée de plusieurs façons :

– Classification des courbes d'AUC à l'aide d'un clustering de type K-means (fonction *cutRepeatedKmeans* du package *ClassDiscovery*) (Figure 31 N). Cette analyse permet de classer les courbes en fonction de leur profil d'évolution et permet d'identifier les souches pour lesquelles le traitement au UV-C est très efficace (diminution rapide de la croissance

levurienne dès la fluence la plus faible, 2000 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$), et les souches pour lesquelles le traitement est peu efficace (croissance levurienne importante même à 10000 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$).

- Analyses de variance multivariées (ANOVA), suivies de tests *post-hoc* de Tukey (fonction HSD.test du package agricolae). Ces analyses permettent de préciser l'effet des différents facteurs sur la croissance : effet de l'espèce, effet du groupe génétique, effet de la fluence, effet de la densité initiale.

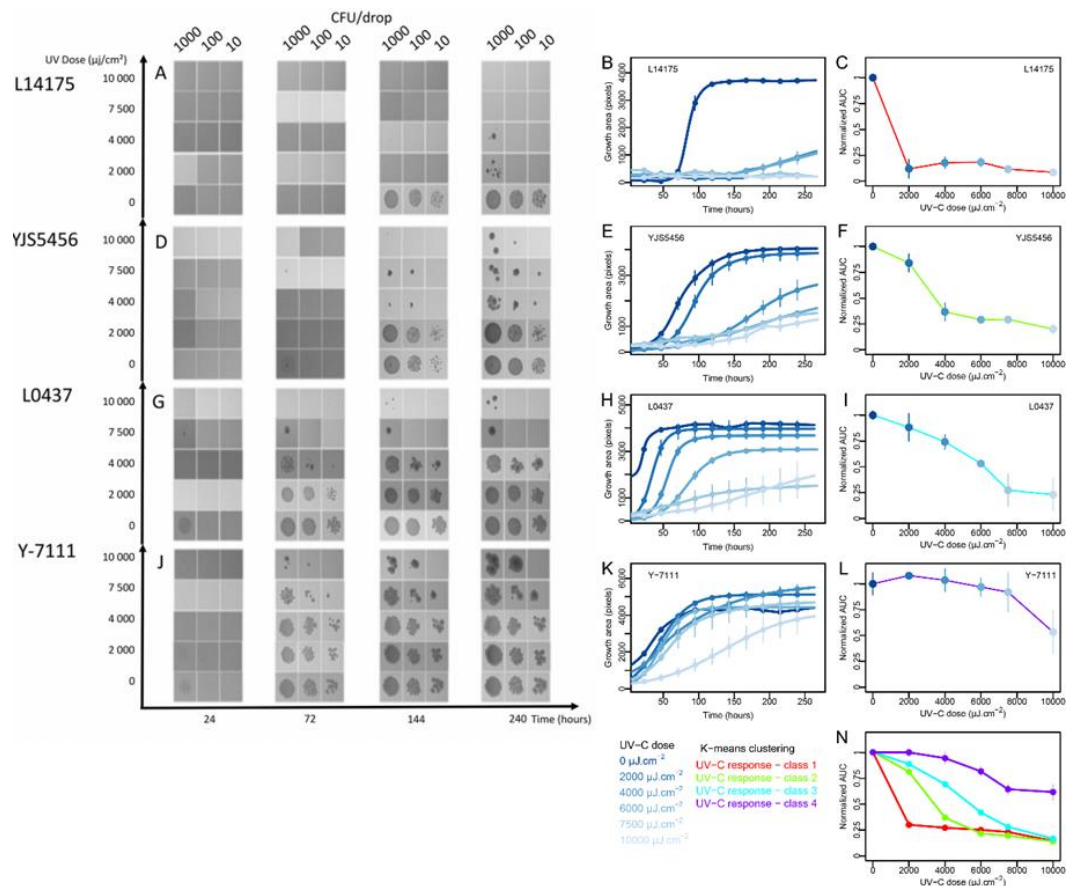


Figure 31 : A, D, G et J : Photographies des boîtes de Petri et croissances des microorganismes pour différents traitements UV-C en fonction du temps ;

B, E, H et K : Cinétique de croissance (en pixels) en fonction du temps obtenues par traitement numérique des photographies

C, F, I et L : AUC en fonction de la fluence UV-C ($\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$)

N : Classification des courbes d'AUC à l'aide d'un clustering de type K-means.

Pour les photographies des boîtes de Petri traitées par LP, la surface de chaque goutte a été calculée automatiquement (en mm^2) après élimination du bruit de fond. Pour chaque combinaison de souche et de traitement (198 souches * 15 modalités de traitement = 2955 combinaisons), une cinétique de croissance correspondant à la surface de goutte (en mm^2) en

fonction du temps d'incubation a ainsi été obtenue. Là encore, différents paramètres de croissance ont été calculés (taille maximale de la population, phase de latence, etc.) et ont donné des résultats similaires. Plusieurs types d'analyses statistiques ont été conduites :

- Analyses de variance multivariées (ANOVA), suivies de tests *post-hoc* de Tukey (fonction HSD.test du package agricolae). Ces analyses permettent de préciser l'effet des différents facteurs sur la croissance : effet de l'espèce, effet du groupe génétique, effet de la fluence par flash, effet de la fluence totale, effet de la fréquence, effet de la densité initiale. Le pourcentage de variation expliqué par les différents facteurs a également été calculé (Figure 32 A).
- Courbes d'isoréponses, permettant de visualiser l'impact de la fluence par flash et de la fluence totale sur la croissance des différentes souches et espèces de levure testées (Figure 32 B).

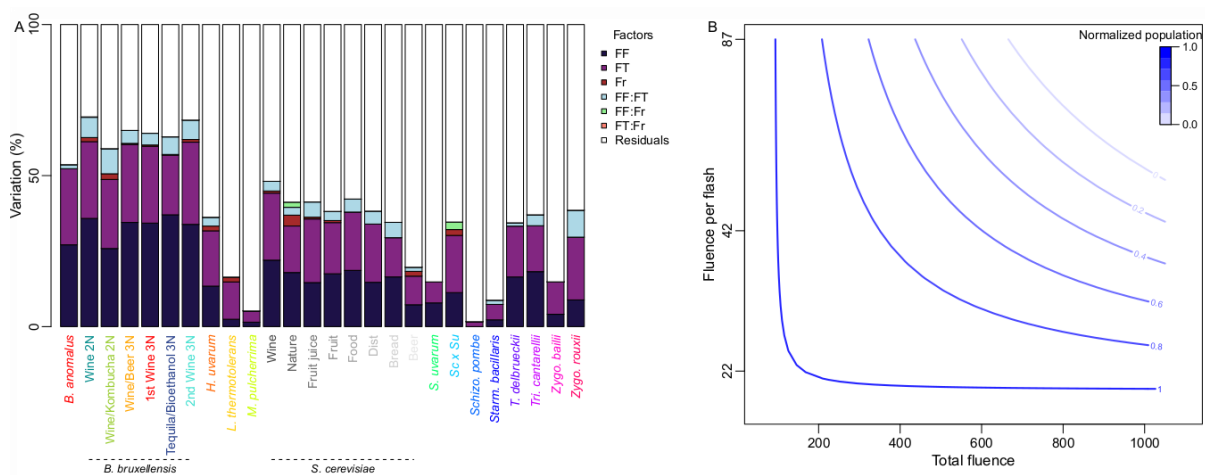


Figure 32 : (A) Pourcentages de variations expliqués par les différents facteurs ; (B) Courbes d'isoréponse

- Classification des courbes de croissance à l'aide d'un clustering de type K-means (fonction cutRepeatedKmeans du package ClassDiscovery). Cette analyse permet de classer les courbes en fonction de leur profil d'évolution et d'identifier les souches les plus sensibles au traitement par la lumière pulsée de celles qui sont peu sensibles.
- Pour les espèces *S. cerevisiae* et *B. bruxellensis*, 51 et 111 souches respectivement ont été analysées, provenant de groupes génétiques et/ou de substrats variés (vin, bière, etc.). L'effet de l'origine des souches a été testé à l'aide d'un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (les données n'ayant pas une distribution normale).

III.2. Efficacité du traitement UV-C pour la stabilisation d'un vin rouge inoculé avec différentes souches de *B. bruxellensis*

III.2.1. Adaptation des souches de *B. bruxellensis* et inoculation dans le vin

100 L de vin Cabernet Sauvignon du millésime 2018 ont été utilisés dans cette étude pour réaliser l'adaptation des levures ainsi que les traitements UV-C. Le coefficient d'absorption du vin à 254 nm (α_{254}) et la turbidité étaient respectivement de 31.6 cm⁻¹ et 170 NTU. Avant d'être utilisé pour l'adaptation des levures et les traitements UV-C le vin a préalablement été pasteurisé (80 °C, pendant 40 minutes sous agitation) et désulfité par ajout de quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène jusqu'à obtention d'une concentration en SO₂ libre inférieure à 5 mg.L⁻¹. La stérilité des vins a été contrôlée après pasteurisation par étalement sur des milieux solides permettant le dénombrement des levures totales (milieu YPD ; extrait de levures à 10 g.L⁻¹ ; peptone à 10 g.L⁻¹ ; D-glucose à 20 g.L⁻¹ ; agar 20 g.L⁻¹ ; chloramphénicol 0.1 mg.mL⁻¹, biphényle 0.15 mg.mL⁻¹) et bactéries totales (milieu « Jus de raisin » ; jus de raisin 250 mL.l⁻¹ ; Tween 80 1 mL ; extrait de levures 5 g.L⁻¹ ; agar 20 g.L⁻¹ ; pimarinine 0.1 mg.mL⁻¹ ; biphényle 0.15 mg.mL⁻¹). Six souches de *B. bruxellensis* (AWRI1608, L1735, L1737, CBS2499, AWRI1499 et L1746) appartenant à trois groupe génétiques différents ont été sélectionnées pour cette étude. Ces souches ont été premièrement cultivées sur milieu solide YPD, puisensemencées séparément en milieu de culture liquide YPD. Afin d'adapter de limiter la mortalité liée au changement de milieu au moment de l'inoculation dans le vin, les levures ont été préalablement adaptées au vin. Cette adaptation a été effectuée par des repiquages successifs dans des milieux de culture contenant des proportions croissantes de vin pasteurisé jusqu'à obtenir une population viable dans un milieu de culture contenant 90% de vin pasteurisé. Le suivi des populations de levure a été réalisé par des comptages journaliers sur cellule de Malassez avec ajout de bleu de méthylène. Juste avant de réaliser les traitements UV-C, chaque souche a étéensemencée seule à une concentration finale de 10⁴ UFC.mL⁻¹ dans trois lots de 5 L de vin rouge pasteurisé (traitements réalisés en triplicata). Au total, dix-huit lots de 5 L de vin rouge pasteurisé ont été inoculés puis traités par rayonnement UV-C (6 souches et réalisation des traitements en triplicata).

III.2.2. Traitements UV-C

Le dispositif de traitement UV-C utilisé pour cet essai est le même que celui décrit précédemment (Matériel et méthodes, partie I.2.2). Les différentes modalités de traitement sont les suivantes :

- UV0 : 0 J.L⁻¹, prélèvement de vin après inoculation
- OFF : 0 J.L⁻¹, prélèvement de vin inoculé après 4 passages consécutifs (lampes UV éteintes)
- UV1 : 1600 J.L⁻¹ prélèvement après 1 passage dans le dispositif
- UV2 : 3200 J.L⁻¹ prélèvement après 2 passages dans le dispositif
- UV3 : 4800 J.L⁻¹ prélèvement après 3 passages dans le dispositif
- UV4 : 6600 J.L⁻¹ prélèvement après 4 passages dans le dispositif

Entre chaque cycle, le dispositif a été désinfecté à l'aide d'éthanol à 95 % (200 L.h⁻¹, pendant 2 minutes). Des échantillons de vin (50 mL) ont été prélevés stérilement et conservés à 4 °C jusqu'à ce que des analyses microbiologiques soient effectuées. Chacun de ces traitements a été réalisé en triplicata pour chacune des souches.

III.2.3. Dénombrement des levures après traitements

Immédiatement après les traitements, les dénombrements ont été réalisés en triplicata, par étalement de 10 µL de dilutions successives (facteur 10) des échantillons de vin prélevés. Les levures ont été cultivées sur milieu solide YPD (extrait de levures à 10 g.L⁻¹; peptone à 10 g.L⁻¹; D-glucose à 20 g.L⁻¹; agar 20 g.L⁻¹; chloramphénicol 0.1 mg.mL⁻¹, biphényle 0.15 mg.mL⁻¹) après 7 jours d'incubation à 27 °C dans l'obscurité. Les résultats des dénombrements sont exprimés en UFC.mL⁻¹ et la limite de détection était de 1 UFC.mL⁻¹. La modalité UV0 a été utilisée comme référence pour le calcul des réductions logarithmique (\log_{10} UFC.mL⁻¹). Des analyses des variances à plusieurs facteurs (ANOVA) ($\alpha = 5\%$) ont été réalisées suivies de tests post-hoc (test de Tukey) lorsque celles-ci se sont avérées significatives (fonction HSD.test du package agricolae, logiciel R).

III.3. Efficacité du procédé de LP pour la stabilisation d'un vin rouge inoculé avec différentes espèces et souches de levures

III.3.1. Adaptation des souches de levure et inoculation dans le vin

18 L de vin rouge de Bordeaux (assemblage Merlot et Cabernet sauvignon du millésime 2019) ont été utilisés à la fois pour l'adaptation des levures et les traitements par LP. Afin de faciliter l'adaptation et la croissance des souches de levures sélectionnées dans le vin, quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène ont été ajoutées jusqu'à l'obtention d'une teneur en SO_2 libre inférieure à 5 mg.L^{-1} . Afin d'assurer la stérilité du vin (pour l'adaptation et l'inoculation des levures), celui-ci a été pasteurisé ($80 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 40 minutes sous agitation) et conservé à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Six souches de *B. bruxellensis* (L1735, L1737, L1746, AWRI1499, AWRI 1608, CBS2499), deux souches de *S. cerevisiae* (FX10, L0437) ainsi qu'une souche *L. thermotolerance* (CLIB292) ont été sélectionnées afin d'étudier leurs niveaux de sensibilité au traitement par LP dans le vin. Ces souches ont d'abord été cultivées sur milieu solide YPD, puis ensemencées en milieu liquide YPD ($24 \text{ }^\circ\text{C}$) et enfin dans du jus de raisin filtré stérilement. Afin de diminuer la mortalité liée au changement de milieu au moment de l'inoculation les différentes souches ont été préalablement adaptées au vin. Cela a été fait en augmentant progressivement la proportion de vin pasteurisé dans le milieu de culture jusqu'à atteindre 90 %. Le suivi des populations a été effectué par comptage sur cellule de Malassez après coloration au bleu de méthylène. Enfin, juste avant la réalisation des traitements par LP, chaque souche a été inoculée seule à une concentration finale de $10^5 - 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ dans trois lots de 500 mL de vin rouge pasteurisé.

III.3.2. Traitement par LP

Les traitements du vin ont été réalisés en flux continu à 9 L.h^{-1} dans un réacteur constitué de tubes FEP de 2 mm de diamètre intérieur (16.5 m de longueur) enroulés autour d'un tube PVC (8 cm de diamètre, 25 cm de longueur). Le réacteur a été placé horizontalement à 15 cm sous la lampe (xénon, 450 W, longueur 20 cm ; FlashLamps, France) dans le dispositif de traitement par LP (LP.Box ; Sanodev, France) (Figure 33).

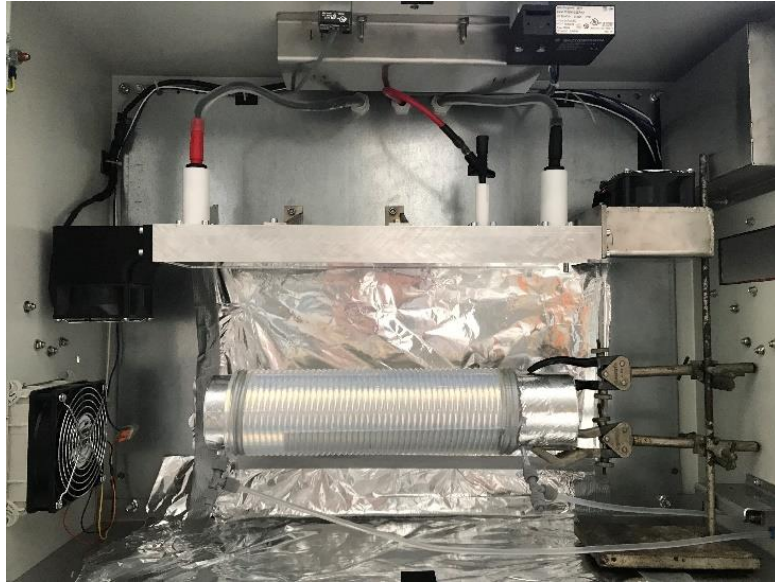


Figure 33 : Dispositif de traitement continu du vin par LP

Ce type de réacteur a été choisi afin de limiter l'épaisseur du liquide traité et d'homogénéiser au maximum le temps de séjour du vin dans le dispositif de LP. Afin d'estimer la fluence théorique appliquée au vin lors d'un passage en réacteur à 9 L.h^{-1} , le calcul suivant a été effectué :

$$V_{tube} = L_{tube} * 2 * \pi * R^2$$

$$RTD = \frac{Q}{V_{tube}}$$

$$n_{flash} = Freq * RTD$$

$$F_{Totale} = n_{flash} * F_{flash}$$

F_{Totale} : Fluence totale (mJ.cm^{-2})
 n_{flash} : Nombre de flashes
 F_{flash} : Fluence par flash (mJ.cm^{-2})
 $Freq$: Fréquence (Hz)
 RTD : Temps de séjour (s)
 Q : Débit ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$)
 V_{tube} : Volume du tube (m^3)
 L_{tube} : Longueur de tube (m)
 R : Rayon interne du tube (m)

Enfin, en raison de la configuration du montage expérimental, nous avons considéré que le vin n'était exposé à la LP que pendant la moitié de son temps de séjour. À partir de cette approximation nous avons estimé la fluence totale théorique reçue par le vin en un passage dans le dispositif de la manière suivante :

$$F_{Totale} = \frac{n_{flash} * F_{flash}}{2}$$

Au cours des traitements, la fréquence de traitement était paramétrée à 4.5 Hz et la fluence par flash égale à 169 mJ.cm^{-2} à la surface du réacteur (valeur fournie par le fabricant pour

une distance de 15 cm et une tension de 4000 V). Le RTD mesuré était de 20 secondes donc le vin recevait théoriquement jusqu'à 45 flashes résultant en une fluence totale de 7.6 J.cm^{-2} par passage dans le réacteur. Chaque lot de 500 mL de vin inoculé a été passé 4 fois consécutivement dans le dispositif. Un premier passage lampe éteinte, suivi de 3 passages consécutifs avec LP. Après chaque passage le vin est récupéré dans un contenant stérile et un échantillon de 5 mL est collecté afin de réaliser le dénombrement des levures. Entre chaque passage le réacteur est rincé puis désinfecté à l'éthanol. Après traitements (réalisés en triplicata), un échantillon de chacune des modalités suivantes a été collecté :

- T0 : prélèvement immédiatement après inoculation.
- OFF : 0 J.cm^{-2} , prélèvement après un passage sans LP.
- T1 : 7.6 J.cm^{-2} prélèvement après un passage avec LP.
- T2 : 15.2 J.cm^{-2} prélèvement après deux passages avec LP.
- T3 : 22.8 J.cm^{-2} prélèvement après trois passages avec LP.

III.3.3. Dénombrement des levures après traitement

Immédiatement après les traitements, les dénombrements ont été réalisés en triplicata, par étalement de $10 \mu\text{L}$ de dilutions successives (facteur 10) des échantillons de vin prélevés. Les levures ont été cultivées sur milieu solide YPD (extrait de levures à 10 g.L^{-1} ; peptone à 10 g.L^{-1} ; D-glucose à 20 g.L^{-1} ; agar 20 g.L^{-1} ; chloramphénicol 0.1 mg.mL^{-1} , biphényle 0.15 mg.mL^{-1}) après 7 jours d'incubation à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ dans l'obscurité. Les résultats des dénombrements sont exprimés en UFC.mL^{-1} et la limite de détection était de 1 UFC.mL^{-1} . La modalité OFF a été utilisée comme référence pour le calcul des réductions logarithmique ($\log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$) de population. Des analyses des variances à plusieurs facteurs (ANOVA) ($\alpha = 5 \%$) ont été réalisées suivies de tests post-hoc (test de Tukey) lorsque celles-ci se sont avérées significatives (fonction HSD.test du package agricolae, logiciel R).

CHAPITRE III : Étude de la variabilité intra et interspécifique vis-à-vis de la sensibilité au traitement UV-C de levures identifiées dans l'environnement vitivinicole

I. Introduction générale

Les potentielles applications de ce procédé en œnologie sont nombreuses et présentent un fort intérêt pour les vinificateurs. Le traitement UV-C pourrait intervenir avant l'inoculation, pour le mutage du vin, pour bloquer la fermentation malolactique, pour assurer la stabilité microbiologique pendant le vieillissement du vin et enfin juste avant la mise en bouteille. Ce type de procédé est attendu par la profession sous réserve de pouvoir inhiber toutes les espèces existantes en œnologie. L'objectif principal de cette partie est d'évaluer les niveaux de sensibilité de différentes souches et espèces de levures fréquemment identifiées en œnologie et d'éventuellement identifier une espèce présentant une résistance particulière à ce procédé.

Afin d'évaluer la diversité intraspécifique et interspécifique au sein d'espèces fréquemment identifiées au cours de la vinification, 147 souches réparties parmi quatorze espèces de levures ont été sélectionnées. Parmi ces levures, une attention toute particulière a été portée à l'espèce *B. bruxellensis* car elle représente un risque majeur de déviation organoleptique. Une méthode de criblage sur milieu solide a été spécifiquement développée en collaboration avec l'Axe Microbiologie de notre unité afin d'évaluer rapidement les niveaux de sensibilité au rayonnement UV-C d'un nombre important de souches.

Dans cette partie, la sensibilité de 147 souches de levures a été évaluée en étudiant leurs cinétiques de croissance sur milieu solide suite à des expositions d'intensités croissantes au rayonnement UV-C (Tableau 34). Pour chacune des souches étudiées, plusieurs densités de population ont été déposées sur milieu solide puis immédiatement exposées à 6 fluences différentes : 0 (modalité contrôle), 2000, 4000, 6000, 7500 et 10 000 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Les différentes modalités de traitement ont été appliquées en faisant varier les temps d'exposition au rayonnement. Suite aux traitements, les boîtes de Petri ont été incubées dans l'obscurité pendant 10 jours à 24 °C. Un suivi photographique journalier a été réalisé sur l'ensemble de la durée d'incubation afin de suivre la croissance des levures suite aux traitements UV-C. Les photographies obtenues ont ensuite été traitées numériquement. Pour chacune des souches, en fonction de chaque traitement et de chaque densité de population, une courbe de croissance correspondant à la surface de croissance (en pixel) en fonction du temps d'incubation a ainsi été obtenue. Les cinétiques de croissance ont par la suite été exprimées

en fonction de l'AUC (Aires sous la courbe ; « Area Under Curve » en anglais) afin de prendre en compte les différentes phases de croissance que sont : la phase de latence, la phase exponentielle et enfin la phase stationnaire. Des cinétiques de croissance correspondant à l'AUC en fonction du temps ont ainsi été obtenues pour chaque combinaison possible de souches, de densité de population et d'intensité de traitement UV-C.

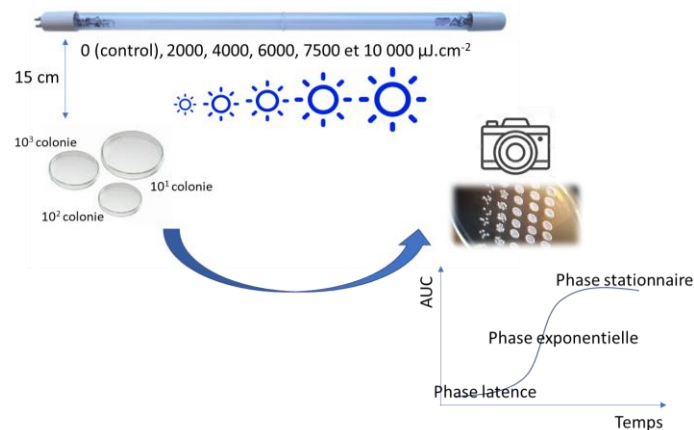


Figure 34 : Schéma du protocole d'étude de la diversité spécifique vis-à-vis de la sensibilité au rayonnement UV-C.

L'étude d'un grand nombre d'espèces et de souches n'a pas pu être réalisée en traitement continu dans le vin en raison des caractéristiques techniques du pilote dont nous disposons. De plus, le traitement UV-C de 147 souches inoculées seules dans le vin induisait un nombre de manipulations trop important, c'est pourquoi l'approche sur milieu solide a été préférée. Cependant, afin de confirmer certains résultats observés sur milieu solide, les niveaux de sensibilités au rayonnement UV-C de 6 souches de *B. bruxellensis* ont été évalués dans le vin. Parmi ces souches, deux sont notamment connues pour leur tolérance au dioxyde de soufre. En raison de contraintes pratiques liées aux caractéristiques du pilote UV-C (100 L de vin nécessaires pour 6 souches), seules les souches de *B. bruxellensis* ont été testées en traitement continu.

Les résultats de ces travaux sont présentés dans la partie suivante sous la forme d'un article publié dans le journal Food Microbiology en décembre 2021.

II. Présentation des résultats

Wine yeast species show strong inter- and intra-specific variability in their sensitivity to ultraviolet radiation

Etienne Pilard¹, Jules Harrouard¹, Cécile Miot-Sertier¹, Philippe Marullo^{1,2}, Warren Albertin^{1,3}
and Rémy Ghidossi¹

¹ Univ. Bordeaux, ISVV, Unité de Recherche Œnologie EA 4577, USC 1366 INRAE, Bordeaux INP, F-33882 Villenave d'Ornon, France.

² Biolaffort, 11 Rue Aristide Bergès, F-33270 Floirac, France.

³ ENSCBP, Bordeaux INP, F-33600 Pessac, France

Abstract:

While the trend in winemaking is toward reducing the inputs and especially sulphites utilization, emerging technologies for the preservation of wine is a relevant topic for the industry. Amongst yeast spoilage in wine, *Brettanomyces bruxellensis* is undoubtedly the most feared. In this study, UV-C treatment is investigated. This nonthermal technique is widely used for food preservation. A first approach was conducted using a drop-platted system to compare the sensitivity of various strains to UV-C surface treatment. 147 strains distributed amongst fourteen yeast species related to wine environment were assessed for six UV-C doses. An important variability in UV-C response was observed at the interspecific level. Interestingly, cellar resident species, which are mainly associated with wine spoilage, shows higher sensitivity to UV-C than vineyard-resident species. A focus on *B. bruxellensis* species with 104 screened strains highlighted an important effect of the UV-C, with intraspecific variation. This intraspecific variation was confirmed on 6 strains in liquid red wine by using a home-made pilot. 6624 J.L⁻¹ were enough for a reduction of 5 log₁₀ of magnitude for 5 upon 6 strains. These results highlight the potential of UV-C utilisation against wine yeast spoiler at cellar scale.

Keywords: UV-C treatment, yeast, microbial stabilization, *Brettanomyces bruxellensis*

II.1. Introduction

In food industry, microbial stabilization is crucial to ensure good storage and aging. In the winemaking industry, wine stabilization is historically managed by using sulphite (SO_2) that has both antioxidant and antimicrobial properties. However, there is a trend is towards reducing the doses of sulphites in wines (Santos et al. 2012). This can be explained by (i) health concerns and a growing consumer preference for wines with the least possible added input; (ii) the fact that strongest sulphite doses are required for an optimal efficiency due to the increase of wine's pH (Van Leeuwen et Darriet 2016a) and (iii) because of the emergence of sulphite resistant strains amongst spoilers (C. Curtin, Kennedy, et Henschke 2012a). Microfiltration and flash-pasteurization are the main technologies used in conventional winemaking even if they are both expensive, highly energy consuming and known to have potential negative impact on both colour and aromatic profile of wines. That is why other chemical and physical control methods are intensively studied (reviewed by Pinto et al. 2020; Tubia et al. 2018; Lisanti et al. 2019).

Recent studies suggested that UV-C treatment (253.7 nm) could be an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and is already used for surface equipment disinfection (Fredericks, du Toit et al., 2011 ; Diesler et al. 2019; Junqua, 2020; Durner et al. 2017). This technology has been widely investigated for two decades and is regarded as a promising approach for fruit juice stabilization with minimal negative impacts (Pala et Toklucu 2013; Gabriel 2012; Abdul Karim Shah et al. 2016). Microbial inactivation caused by UV-C radiation is based on the rearrangement of the microorganism's nucleic acid and DNA-protein cross link (Cyclobutane Pyrimidine Dimers, CPDs) which directly interferes with the ability of microorganisms to reproduce (Gabriel et Nakano 2009; Bintsis, Litopoulou-Tzanetaki, et Robinson 2000; Friedberg, Lehmann, et Fuchs 2005; Tran et Farid 2004). Different studies showed a wide spectrum of inactivation of wine-associated microorganisms in different types of wines and grape juices. Fredericks et al, Diesler et al, and Junqua et al demonstrated a reduction of 5 to 6 \log_{10} of magnitude in yeast and bacteria species in various wines and grape musts (Fredericks, du Toit, et Krügel 2011a; Diesler et al. 2019a; Rémy Junqua, Vinsonneau, et Ghidossi 2020a). Those studies showed a positive correlation between UV-C dosage and microbiological stabilisation, with the treatment efficiency depending on physical properties of the matrix (e.g., optical density at 254 nm, turbidity), the considered species and the

population level. For example, to obtain a reduction of 6 log₁₀ of magnitude of *S. cerevisiae*, 800 J.L⁻¹ are required for rosé and white wines ($\alpha_{254nm} < 10 \text{ cm}^{-1}$) when 5 000 J.L⁻¹ is necessary for red wine ($\alpha_{254nm} = 47 \text{ cm}^{-1}$) (Junqua et al., 2020). To obtain a reduction of 6 log₁₀ of magnitude of *S. cerevisiae*, 600 J.L⁻¹ are required for clear Riesling must (turbidity 26.7 NTU) when 800 J.L⁻¹ is necessary for Müller-Thurgau must (turbidity 36 NTU) (Diesler et al., 2019). Regarding population level, 600 J.L⁻¹ allow the stabilization of Müller-Thurgau must inoculated at 10⁴ cell.mL⁻¹ initial cell count, when 1 400 J.L⁻¹ is not sufficient for 10⁸ initial cell count (Diesler et al. 2019a). Considering the bacteria and yeast, 200 J.L⁻¹ are sufficient to inactivate *Acetobacter aceti* when 400 J.L⁻¹ are required for *Brettanomyces bruxellensis* and 600 J.L⁻¹ for *S. cerevisiae* (Junqua et al., 2020). However, these studies compared only a few number of species and strains and did not take into account the intraspecific variability.

In winemaking, a plethora of yeasts is present, originating from the vineyard (e.g., present on the grape surface) or from the winery. These species can be considered as positive, neutral or negative from a winemaking viewpoint (Loureiro et Malfeito-Ferreira 2003). Wine yeast spoilage is problematic due to contamination by *Brettanomyces bruxellensis*, *B. anomalus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Z. bailii*, *Trigonopsis cantarellii*, etc. (Cocolin et al. 2004; Portugal et al. 2015; Loureiro et Malfeito-Ferreira 2003). Among them, *B. bruxellensis* is considered as the major contaminant in wine due to its ability to produce volatile phenols (4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol and 4-vinylphenol) causing the 'Brett' taint described as barnyard, horse sweat or burnt plastic (Chatonnet et al. 1992a). *B. bruxellensis* can spoil up to 25-30% of red wine production (Gerbaux, Jeudy, et Monamy 2000; Romano et al. 2008). This species displays a huge genetic and phenotypic diversity (Avramova et al. 2018; Serra Colomer et al. 2020; Gounot et al. 2020; Crauwels et al. 2017). Isolates cluster in six genetic groups depending on the ploidy level, the substrate of isolation and geographical niches (Avramova et al., 2018; Gounot et al., 2020; Serra Colomer et al., 2020). *B. bruxellensis* strains isolated from wine mainly belong to three genetic groups defined as 1st Wine 3N (or AWRI1499-like), Wine 2N (or CBS2499-like) and Wine/Beer 3N (or AWRI1608-like) which respectively encompass 39%, 37% and 16% of isolates (Avramova, Cibrario, et al. 2018; Cibrario et al. 2019). Concerning control methods for wine production, *B. bruxellensis* is an actual challenge (Pinto et al. 2020): up to 45% of wine isolates are sulphite tolerant or resistant (Avramova, Vallet-Courbin, et al. 2018). Tolerant/resistant strains mainly belong to the 1st

Wine 3N group. In addition, *B. bruxellensis* isolates exhibit variable sensitivity to other treatments such as chitosan (Bağder Elmacı et al. 2015; Petrova, Cartwright, et Edwards 2016a). Recently, Paulin et al showed that, in a representative collection of 53 *B. bruxellensis* isolates, 41% of strains were sensitive to chitosan, 13 % of tolerant and 46 % with intermediary behaviour (Paulin et al. 2020). Thus, it is necessary to take into account the phenotypic variability of *B. bruxellensis* in order to properly assess its UV-C sensitivity to microbial treatment, by using a representative panel of strains belonging to the different genetic cluster of this species.

In this work, we first evaluated the efficiency of UV-C treatment using a plate screening (surface) approach. We tested 14 yeast species and 147 strains associated with winemaking, in order to appreciate the relative interspecific variability. We particularly focused on *B. bruxellensis* species for which 104 representative isolates were tested. Considering the first results, we selected 6 strains of *B. bruxellensis* belonging to the three main genetic groups found in wine and harbouring different sensitivity to UV-C on solid medium in order to assess the efficiency of UV-C treatment in (liquid) red wine.

II.2. Materials and methods

II.2.1. Yeast strains

The 147 strains from 14 species used in this study were collected from different origins: the CRB Oenology collection (Centre de Ressources Biologiques Oenologie, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, France) or other laboratories/collections (Tableau 8). Strains were grown and maintained in YPD plates at 24 °C (10 g.L⁻¹ yeast extract, 10 g.L⁻¹ peptone, 20 g.L⁻¹ glucose, 20 g.L⁻¹ agar).

Tableau 8 : Strains used in this work.

Species	Number and strains ID
<i>B. anomalus</i>	3 strains: BR 23-4 ; CLIB 304 ; NRRL Y-17522 T
<i>B. bruxellensis</i>	<p>1st Wine 3N - 22 strains: 2OT13_02 ; 33_2 ; AWRI1499 ; GB12 ; GSP1509 ; CRBO L0417 ; CRBO L14155 ; CRBO L14174 ; CRBO L14175 ; CRBO L14194 ; CRBO L1703 ; CRBO L17111 ; CRBO L1727 ; YJS5408 ; YJS5434 ; YJS5445 ; YJS5459 ; YJS5469 ; YJS5473 ; YJS5476 ; YJS5478 ; YJS5487</p> <p>Wine/Kombucha 2N - 19 strains: 15_1 ; ISA1601 ; YJS5301 ; YJS5310 ; YJS5334 ; YJS5340 ; YJS5344 ; YJS5349 ; YJS5363 ; YJS5368 ; YJS5384 ; YJS5398 ; YJS5402 ; YJS5406 ; YJS5407 ; YJS5413 ; YJS5417 ; YJS5420 ; YJS5431</p> <p>Wine 2N - 30 strains: 1961_MX_M1_E2 ; CBS 2499 ; ISA2150 ; CRBO L0469 ; CRBO L0614 ; CRBO L14163 ; CRBO L1714 ; CRBO L1751 ; YJS5302 ; YJS5319 ; YJS5320 ; YJS5345 ; YJS5347ww ; YJS5357 ; YJS5373 ; YJS5385 ; YJS5392 ; YJS5416 ; YJS5422 ; YJS5426 ; YJS5440 ; YJS5447 ; YJS5449 ; YJS5453 ; YJS5456 ; YJS5458 ; YJS5461 ; YJS5463 ; YJS5479 ; YJS5485</p> <p>Wine/Beer 3N - 21 strains: 2OT13_05 ; 2OT13_07 ; 2OT14_01 ; 2OT14_03 ; AWRI1608 ; CDR222 ; GB62 ; ISA2397 ; CRBO L17112 ; CRBO L1741 ; CRBO L1749 ; CRBO L1771 ; LB15107g ; LB15110g ; NL045 ; NL059 ; VP1519 ; YJS5396 ; YJS5397 ; YJS5400 ; YJS5454</p> <p>Tequila/bioethanol 3N - 5 strains: CRBO L14169 ; CRBO L17108 ; CRBO L1715 ; SJ12_4 ; UWOPS_92__298_4</p> <p>2nd Wine 3N - 7 strains: ISA2211 ; CRBO L0308 ; CRBO L1733 ; CRBO L1782 ; VP1539 ; VP1544 ; YJS5382</p>
<i>H. uvarum</i>	3 strains: L1433 ; NZ15 ; Y-1614
<i>L. thermotolerans</i>	3 strains: 18 ; AEB ; CLIB292
<i>M. pulcherrima</i>	3 strains: L0675 ; NZ268 ; Y-7111
<i>S. cerevisiae</i>	10 strains: A24 ; Fx 10 ; GN ; CRBO L0431 ; CRBO L0432 ; CRBO L0433 ; CRBO L0437 ; SB ; X5 ; Y7327
<i>S. uvarum</i>	2 strains: U1 ; U3
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. uvarum</i>	2 strains: DU23 ; EU23
<i>Schizo. pombe</i>	3 strains: CRBO L0442 ; Y-11791 ; Y-12796
<i>Starm. bacillaris</i>	3 strains: 10_372 ; CRBO L0473 ; NZ12
<i>T. delbrueckii</i>	3 strains: B172 ; CLIB 230 ; CRBO L0705
<i>Tri. cantarellii</i>	3 strains: CRBO L0412 ; CRBO L0416 ; CRBO L0419
<i>Zygo. bailii</i>	3 strains: CLIB 213 ; CRBO L0446 ; CRBO L0536
<i>Zygo. rouxii</i>	2 strains: CLIB 233 ; CRBO L0314

II.2.2. Surface UV-C treatment of yeast

Strains were grown in liquid media (YPD 10 g.L⁻¹ yeast extract, 10 g.L⁻¹ peptone, 20 g.L⁻¹ glucose) for 24 hours and the population was estimated by optical density (FLUOstar Omega, MNGLabtech, France). Two µl of serial dilutions (0.5, 0.05 and 0.005 DO) were spotted onto solid medium (YPD), aiming at 3 different densities (around 1000, 100 and 10 CFU.drop⁻¹). Drops were performed in triplicate for each condition. Spotted plates were exposed to increasing UV-C doses using an apparatus made at the laboratory. The UV-C treatment unit consists of a box containing two 45W@UV-C low-pressure mercury lamps placed 15cm above the plates. Six increasing UV-C doses (0, 2000, 4000, 6000, 7500 and 10 000µJ.cm⁻²) were applied by varying the exposure times. UV-C doses were monitored (in µJ.cm⁻²) using a UV-C sensor (HD2102.2 with LP 471 UV-C probe from DeltaOHM, Italy).

II.2.3. Growth monitoring from agar-plates

After treatment, plates were incubated at 24°C in the dark. The growth was monitored every day: plates were imaged from an illuminated desk to avoid light gleam (model DMC-FS7, Panasonic Corporation, Japan, see Figure 2A, D, G, J). Growth data was analysed with custom-made scripts in R (R Development Core Team, 2013). Briefly, plate images were imported on R using the *OpenImageR* package. The images of the plates were cropped for superimposition and the position of the drops was determined by manual clicking using the *grid* package and the *grid.locator* function. The area of each drop (in pixel) was calculated using automatic background subtraction. The dataset (around 90 000 measures including triplicates) was used to represent growth kinetics (Figure 2B, E, H, K).

In order to analyse and normalize the obtained dataset, the growth kinetics were expressed as AUC (Area Under Curve). This unique parameter takes into account variations in lag-phases, exponential phases and the stationary phases. For each treatment and strain, growth kinetics were fitted using a three-parameter log-logistic distribution, AUCs were calculated and then normalized against AUCs without UV-C treatment (*Normalized AUC*, see Fig 2C, F, I, L). The maximal growth area (a proxy for maximal population) was also considered for ANOVA analyses and gave similar results to normalized AUC. AUC curves were analysed using K-means clustering (*cutRepeatedKmeans* function from *ClassDiscovery* package). Multi-way analyses of

variance (ANOVA) were performed followed by post-hoc Tukey tests (*HSD.test* function from *agricolae* package).

II.2.4. UV-C treatment of red wine

100 L of SO₂ free 2018 Cabernet Sauvignon wine were used in this study for both yeast adaptation and UV-C treatments. Wine's absorption coefficient at 254 nm (α_{254}) and turbidity were equal to 31.6 cm⁻¹ and 170 NTU respectively. The wine was pasteurized and kept at 10°C until UV-C treatment. Wine sterility was controlled after pasteurization and before inoculation by plating on Total yeast, non-Saccharomyces yeast, Lactic Acid bacteria and Acetic bacteria medias.

AWRI1608, L1735, L1737, CBS2499, AWRI1499 and L1746 *B. bruxellensis* strains were selected for this liquid assay. Those strains were firstly grown on YPD plates, and then inoculated in YPD liquid medium (24 °C). Yeasts were adapted to wine by successive transplantations in pasteurised wine. Populations were monitored by counting on Malassez cell with addition of methylene blue. Each strain was inoculated alone at a final concentration of 10⁴ CFU.mL⁻¹ in three 5 L batches of pasteurized red wine. In total, eighteen 5 L of inoculated red wine were UV-C treated, for a total of 90 L of wine.

II.2.5. UV-C treatment device

The UV treatment device consists of 4 modules connected in series. Each module consists of a low-pressure mercury amalgam germicidal lamp, 78 cm long with maximum peak radiation at 254 nm, surrounded by a quartz sleeve (Suzhou Xicheng Water Treatment Equipment, China). A food grade fluorinated ethylene propylene (FEP) tube (Serto S.A.R.L, France), diameter 8/10 mm (inner/outer), chosen for its physical properties (flexibility and good UV-C transmittance), was coiled around the quartz sleeve (Figure 35).

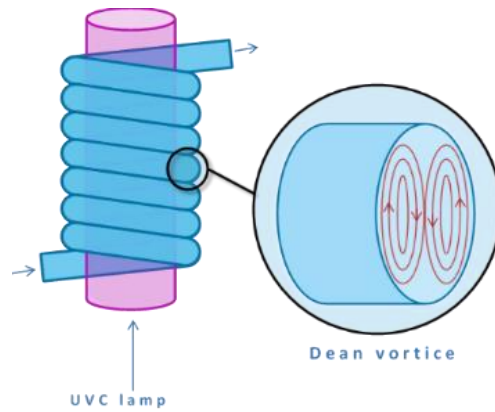


Figure 35 : Schematic representation of coiled UV-C reactor

Due to the curvature of the pipe and hydrodynamic conditions applied, Dean Vortices are generated allowing a homogenous treatment. Wine flow rate in the pipe was 200 L.h^{-1} and the applied dose for a single cycle of treatment was 1656 J.L^{-1} . Wine samples were collected before UV-C treatment (UV0), after four cycles in the pilot with lamps turned off (OFF), after one, two, three of four cycles (UV1 = 1656 J.L^{-1} , UV2= 3312 J.L^{-1} , UV3= 4968 J.L^{-1} , and UV4 = 6624 J.L^{-1}). Each cycle corresponds to the circulation of the liquid in 4 consecutive UV-C modules, each module providing an UV-C dose of 414 J.L^{-1} (estimated by actinometry). Between each cycles, the reactor was disinfected using 95% ethanol. Wine samples (50 mL) were collected and stored at 4°C until microbiological analyses were performed. Each trial was conducted in triplicate.

II.2.6. Iodide/Iodate actinometry

The UV-C dose absorbed by the liquid after flowing through one module at 200 L.h^{-1} was measured and calculated as described in Muller et al. (2014) using the chemical iodide/iodate actinometer. The actinometric solution was prepared in the given quantities (0.6 M potassium iodide and 0.1 M potassium iodate in 0.01 M borate buffer (pH 9.25) and UV-C treated at 200 L.h^{-1} in the coiled tube reactor. Samples were taken before (control) and after UV-C treatment. To determine the quantum yield, the control samples were measured photometrically at 300 nm, and the mean of the temperature before and after treatment was calculated. Samples were measured at 352 nm, and UV-C doses (J.L^{-1}) were calculated as described in Muller et al. (2014). All experiments were done in triplicate.

II.2.7. 2.7. Microbiological analysis

Microbial counts were determined in triplicates by plating serial 10-fold dilutions of the samples and 100 μL was plated in 9cm diameter petri dishes. Yeasts were enumerated on YPD plates with chloramphenicol (0.1 mg.mL^{-1}), biphenyl (0.15 mg.mL^{-1}) and actidione (0.5 mg.mL^{-1}) after 7 days of incubation at 27 °C. All incubations were performed in the dark, as DNA repair mechanisms are known to be less effective in dark conditions (Salcedo et al. 2007). The number of colonies counted was expressed in CFU.mL^{-1} and the limit of detection was 1 CFU.mL^{-1} . Multi-way analyses of variance (ANOVA) were performed followed by post-hoc Tukey tests (*HSD.test* function from *agricolae* package, R software).

II.3. Results

II.3.1. Surface UV-C treatment

II.3.1.1. UV-C treatment and interspecific variability

In this work, UV-C sensitivity was assessed for 147 strains from fourteen yeast species associated with grape must and wine (Tableau 8). Besides some *Saccharomyces* species (*S. cerevisiae*, *S. uvarum* and some of their hybrids), several non-*Saccharomyces* species considered as beneficial from an oenological viewpoint were tested: *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima*. Abundant species associated with grapes or pre-fermentative stages such as *H. uvarum* or *S. bacillaris* were also included, as well as six species mostly considered as wine spoilers: *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *Tri. cantarelli*, *S. pombe*, *Z. rouxii* and *Z. bailii*.

Drop-plating was used to study UV-C sensitivity of the 147 yeast strains. Six increasing UV-C doses were applied (0, 2000, 4000, 6000, 7500 and 10 000 $\mu\text{J.cm}^{-2}$) for three densities (number of initial cells per drop around 10, 100 or 1000). Petri dishes were pictured almost every day during ten days and the growth area was measured using home-made R-script. The dataset (around 90,000 measures with triplicates) was used to represent growth kinetics with time (Figure 36 : Impact of UV-C treatment on growth of four yeast strains.).

Four different strains, representative of typical behaviours observed, are shown in Figure 36 : Impact of UV-C treatment on growth of four yeast strains. (two *B. bruxellensis*, one *S. cerevisiae*, one *M. pulcherrima*). In general, higher UV-C doses increased the lag-phase and decreased the growth rate and the maximal population (Figure 36 : Impact of UV-C treatment on growth of four

yeast strains. B, E, H, K). Growth curves were then used to calculate the normalized AUC (Area Under Curve) represented in Figure 36 : Impact of UV-C treatment on growth of four yeast strains. C, F, I and L. Strain L14175 (*B. bruxellensis*) was highly sensitive to UV-C and showed a strong growth decrease for low UV-C dose (< 0.25 of Normalized AUC at 2 000 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, Figure 36 : Impact of UV-C treatment on growth of four yeast strains. C). Strains YJS5456 and L0437 (*B. bruxellensis* and *S. cerevisiae* respectively, Figure 36 : Impact of UV-C treatment on growth of four yeast strains. E and H) were sensitive to higher dose of UV-C (4000 and 7500 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$). By contrast, some strains appeared poorly impacted by low UV-dose: the growth of *M. pulcherrima* strain Y-7111 (Figure 36 : Impact of UV-C treatment on growth of four yeast strains. J and K) was poorly affected by UV-C-dose lower than 7500 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$.

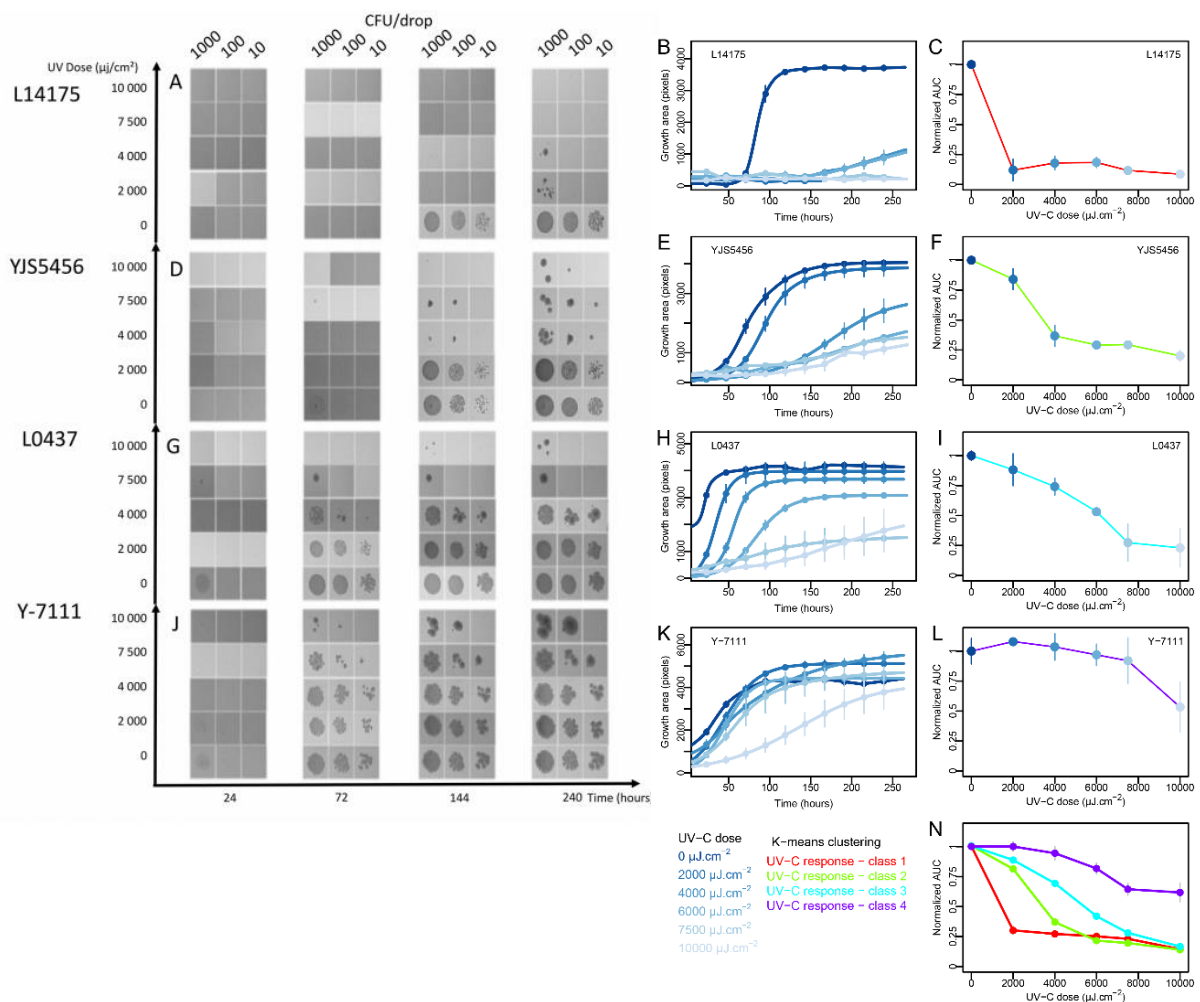


Figure 36 : Impact of UV-C treatment on growth of four yeast strains.

L14175 (*B. bruxellensis*, A,B,C), strain YJS 5456 (*B. bruxellensis*, D,E,F), L0437 (*S. cerevisiae*, G,H,I) and Y-7111 (*M. pulcherrima*, J,K,L). A, D, G, J are images from the three dilutions made on petri dishes with different UV-C doses. B, E, H, K show growth area (in pixels) over time for increasing UV-C treatment for the same density (1000 cells/drop). Growth kinetics were used to calculate AUC (Area Under Curve), normalized so that AUC equals 1 for UV=0 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$. C, F, I, L show normalized AUC depending on UV-C treatment. The mean of three replicates +/- standard errors were represented for each UV-C dose. Colours (red, green,

turquoise and violet) represent the different AUC-UV-C dose response classes determined by K-means clustering (N). L14175 and L0437 stand for CRBO L14175 and CRBO L0423 respectively.

K-means clustering was used to sort AUC curves in different profiles, and resolved into four classes (Figure 36 : Impact of UV-C treatment on growth of four yeast strains. N). The fourteen tested species were sorted into one or two classes except for *B. bruxellensis*, which was distributed in three classes (Tableau 9). K-means class 1 corresponded to the most UV-C sensitive strains, and contained only *B. bruxellensis* strains. By contrast, all tested strains from *S. pombe* or *S. bacillaris* were sorted into class 4, corresponding to less UV-C sensitive behaviour.

Tableau 9 : K-means classes from Normalized AUC with a number of strains per species or genetic groups for the *B. bruxellensis* species.

The present the number of strains in each class, out of the total number of tested strains in each species, or each genetic group (6) for *B. bruxellensis*.

UV-C response (K-means clustering)	Species // genetic groups	Number of strains
Class 1	<i>B. bruxellensis</i> // Wine/Kombucha 2N	3/19
	<i>B. bruxellensis</i> // 1st Wine 3N	7/22
	<i>B. bruxellensis</i> // Wine/Beer 3N	5/21
	<i>B. bruxellensis</i> // Tequila/Bioethanol 3N	2/5
	<i>B. bruxellensis</i> // Wine 2N	6/30
Class 2	<i>B. bruxellensis</i> // Wine/Kombucha 2N	10/19
	<i>B. bruxellensis</i> // 1st Wine 3N	15/22
	<i>B. bruxellensis</i> // Wine/Beer 3N	14/21
	<i>B. bruxellensis</i> // Tequila/Bioethanol 3N	2/5
	<i>B. bruxellensis</i> // Wine 2N	17/30
	<i>B. bruxellensis</i> // 2nd Wine 3N	6/7
	<i>B. anomalus</i>	3/3
	<i>Tri. cantarellii</i>	3/3
<i>Zygo. rouxii</i>	1/2	
Class 3	<i>B. bruxellensis</i> // Wine/Kombucha 2N	6/19
	<i>B. bruxellensis</i> // 1st Wine 3N	1/22
	<i>B. bruxellensis</i> // Wine/Beer 3N	2/21
	<i>B. bruxellensis</i> // Tequila/Bioethanol 3N	1/5
	<i>B. bruxellensis</i> // Wine 2N	7/30
	<i>B. bruxellensis</i> // 2nd Wine 3N	1/7
	<i>H. uvarum</i>	1/3
	<i>L. thermotolerans</i>	1/3
	<i>S. cerevisiae</i>	9/11
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> x <i>Saccharomyces uvarum</i>	2/2
	<i>Zygo. bailii</i>	2/3
Class 4	<i>H. uvarum</i>	2/3
	<i>L. thermotolerans</i>	2/3
	<i>M. pulcherrima</i>	3/3

<i>S. cerevisiae</i>	2/11
<i>S. uvarum</i>	3/3
<i>Schizo. pombe</i>	3/3
<i>Starm. bacillaris</i>	3/3
<i>T. delbrueckii</i>	3/3
<i>Zygo. bailii</i>	1/3
<i>Zygo. rouxii</i>	1/2

In order to determine whether yeast growth was mostly affected by UV-C treatment, density and/or species, we performed a three-way ANOVA for normalized AUC (Tableau 10, 1st ANOVA). All three factors (Species, drop density and UV-C dose) were strongly significant, with very low p-values (< 0.001). UV-C dose explained most of the percentage of variation of the data (59.99 %) followed by species and density factors (8.93 % and 1.71 % respectively). Similar results were obtained for maximal growth area (Tableau 10): all three factors (species, drop density and UV-C dose) were highly significant and explained similar variation magnitude. Thus, *normalized AUC* was retained for subsequent analyses and representation. Post-hoc Tukey tests were performed to determine significance groups (Figure 37): the different UV-C dose were significantly separated from one another, with 10 000 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ associated to the lower Normalized AUC (i.e., lower yeast growth) (Figure 37 A). For drop density, higher initial densities were associated with higher growth (Figure 37 B). Finally, Tukey tests revealed significant differences between species, with *Schizo. Pombe* and *M. pulcherrima* showing highest Normalized AUC at high UV-C doses, and *Tri. Canterellii* and *B. anomalus* showing the lowest Normalized AUC (Figure 37 C) in accordance with K-means clustering. In particular, *Schizo. pombe*, *M. pulcherrima*, *Starm. bacillaris* and *L. thermotolerans* display a poor sensitivity to the two first UV-C doses used (2 000, 4 000 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, Figure 37 C) with a low reduction of the Normalized AUC. For the others species, all UV-C doses affected the yeast growth.

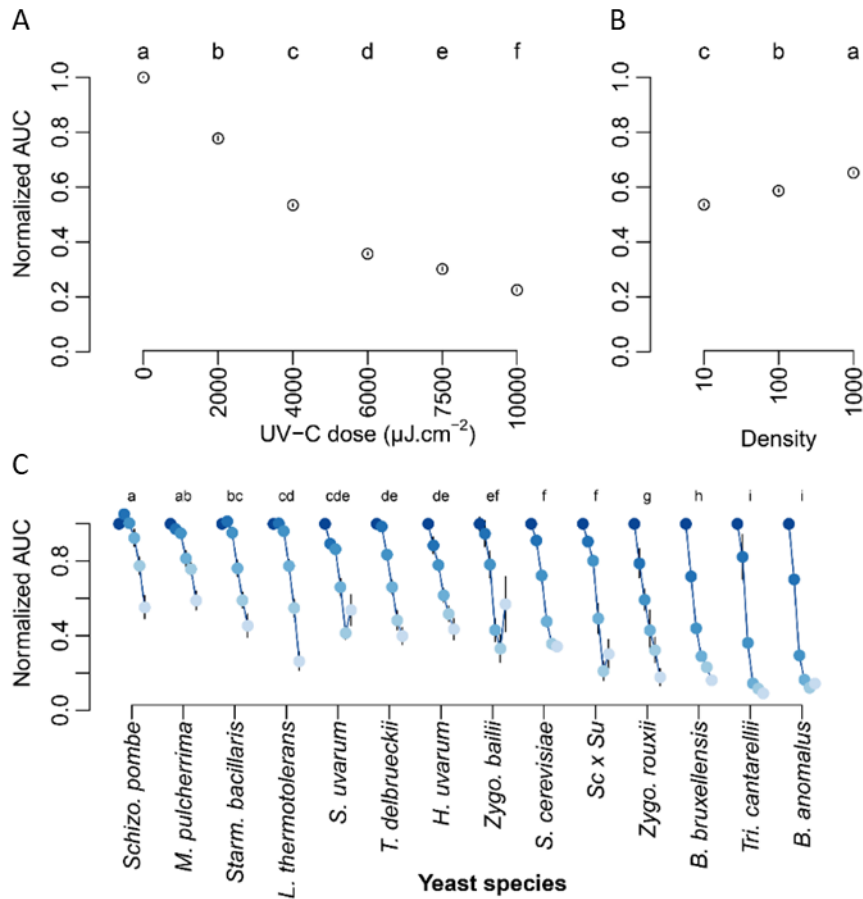


Figure 37 : Impact of UV-C treatment (A), drop density (B) and species (C) on yeast growth.

Yeast growth was assessed using Normalized AUC. The mean of repetitions +/- standard errors were represented for each factor. Upper letters represent significance groups (ANOVA followed by Tukey's post-hoc test, $\alpha = 5\%$). Sc x Su stands for *S. cerevisiae* x *S. uvarum* hybrids

Tableau 10 : Impact of various factors on yeast growth.

Analysis of variance was performed either on the whole dataset (147 strains distributed in 14 species) or only on the *B. bruxellensis* strains (104). Two growth parameters were considered (normalized AUC and maximal growth area).

1st ANOVA					
Factors	Degree of Freedom	normalized AUC		maximal growth area	
		Percentage of Variation	P-values	Percentage of Variation	P-values
Species	13	8.93%	$<2e^{-16}$	7.95%	$<2e^{-16}$
Drop density	2	1.71%	$6.71e^{-127}$	4.73%	$3.70e^{-244}$
UV-C dose	5	59.99%	$<2e^{-16}$	39.04%	$<2e^{-16}$
Residuals	10262	29.37%		48.28%	
2nd ANOVA					
Factors	Degree of Freedom	normalized AUC		maximal growth area	
		Percentage of Variation	P-values	Percentage of Variation	P-values
Genetic group	5	0.51%	$5.39e^{-32}$	1.96%	$4.21e^{-81}$
Drop density	2	1.47%	$1.07e^{-96}$	5.71%	$3.72e^{-233}$
UV-C dose	5	74.83%	$<2e^{-16}$	51.36%	$<2e^{-16}$
Residuals	7197	23.18%		40.97%	

II.3.1.2. *B. bruxellensis* sensitivity

In winemaking, the most of the spoilage treat is due to *B. bruxellensis*. Here, we included 104 strains of *B. bruxellensis* distributed in all defined genetic groups (6) to assess their sensitivity to UV-C treatment (Tableau 8). K-means clustering sorted *B. bruxellensis* in three classes, suggesting a large intraspecific variability. To determine whether UV-C treatment, density and/or genetic group affected strain growth, we performed a three-way ANOVA followed by Tukey test (Tableau 10, 2st ANOVA). All three factors significantly affected *B. bruxellensis* growth (p-values < 0.001), with UV-C dose, density and genetic group explaining respectively 74.83, 1.47 and 0.51% of the total variation. The higher the UV-C dose, the lower the growth (Figure 38 A) while lower drop densities were associated with lowest growth (Figure 38 B). When considering the effect of the genetic group (Figure 38 C), significant differences were recorded for 2000, 4000, 6000 and 7500 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ UV-C doses. At 2 000 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, three groups (2nd Wine 3N, Wine/Kombucha 2N, Wine 2N) showed higher normalized AUC (Tukey test 'a') than Wine/Beer 3N, 1st Wine 3N and Tequila/Bioethanol 3N (Tukey 'b'). For higher UV-C doses, the rank of the genetic groups changed marginally, but in general, the Wine/Kombucha 2N group was one of the less sensitive group, while the 1st Wine 3N was systematically the most impacted by UV-C.

Finally, at the higher UV-C dose tested (10000 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$), the normalized AUCs were below 0.2 for all genetic groups without significant difference, indicating that UV-C treatment is efficient for all *B. bruxellensis* strains.

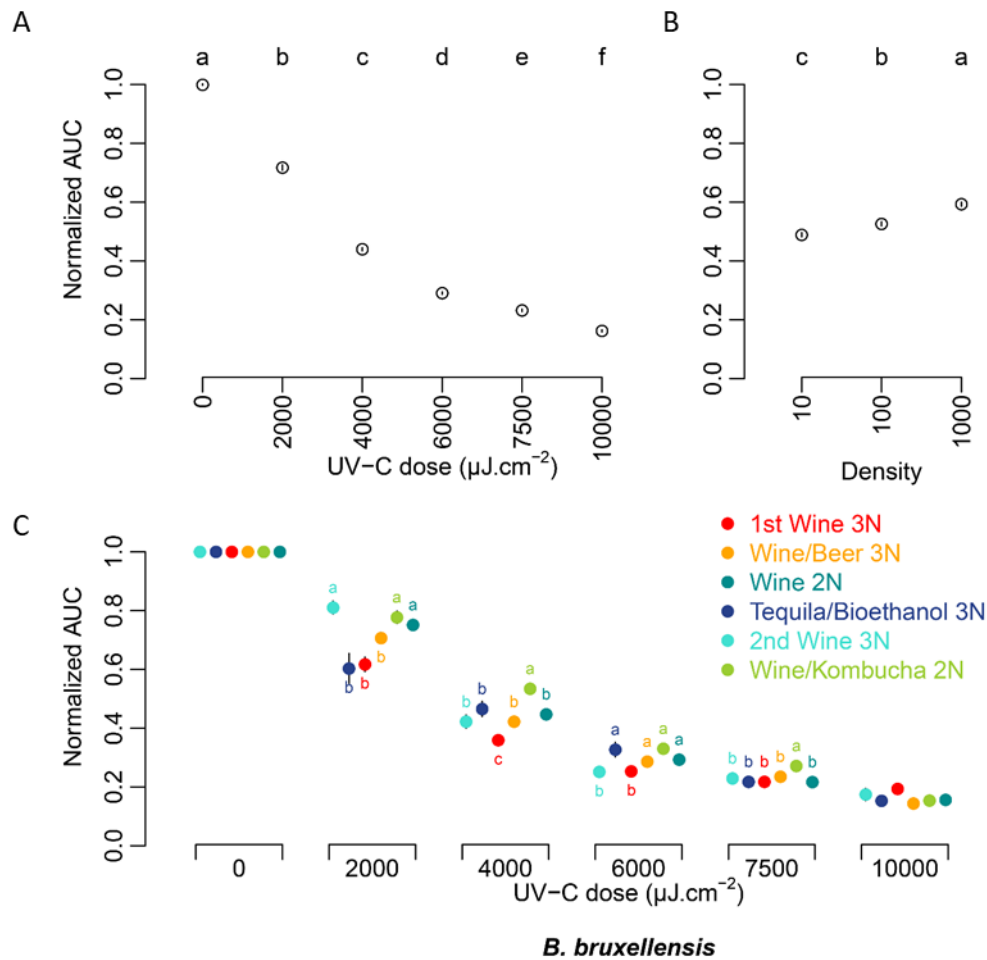


Figure 38 : Impact of UV-C treatment (A), drop density (B) and species (C) on yeast growth regarding the genetic groups of 104 strains of *B. bruxellensis*.

Yeast growth was assessed using Normalized AUC. The mean of repetitions \pm standard errors were represented for each factor. Upper letters represent significance groups (ANOVA followed by Tukey's post-hoc test, $\alpha = 5\%$).

II.3.2. UV-C and liquid media

The impact of UV-C treatment on *B. bruxellensis* strains in liquid wine was evaluated. The UV-C pilot was designed for the treatment of large volumes of wine, and 100 L of red wine were used to evaluate the impact of different UV-C doses on a few strains. Six strains of *B. bruxellensis* were studied, belonging to the three main genetic groups associated with winemaking (Wine 2N, 1st Wine 3N and Wine/Beer 3N). Log_{10} reduction has been used as the factor describing the strain response to UV-C treatments in wines (Figure 39). A two-way ANOVA was performed to determine the effect of UV-C dose and strain on the treatment efficiency. Both factors were strongly significant (p -value < 0.001) and explained most of the percentage of data variation, with 74.4 % for UV-C dose and 3.7 % for strain.

No significant difference was recorded between UV0 and OFF modalities indicating that pumping through the UV-C reactor did not induce cell mortality. UV1 (1656 J.L⁻¹), UV2 (3312 J.L⁻¹), UV3 (4968 J.L⁻¹) and UV4 (6624 J.L⁻¹) treatments were all significantly different from both controls (UV0 and OFF) and between each other, with the greater the UV-C dose applied, the greater the logarithmic reduction achieved (Figure 39 A).

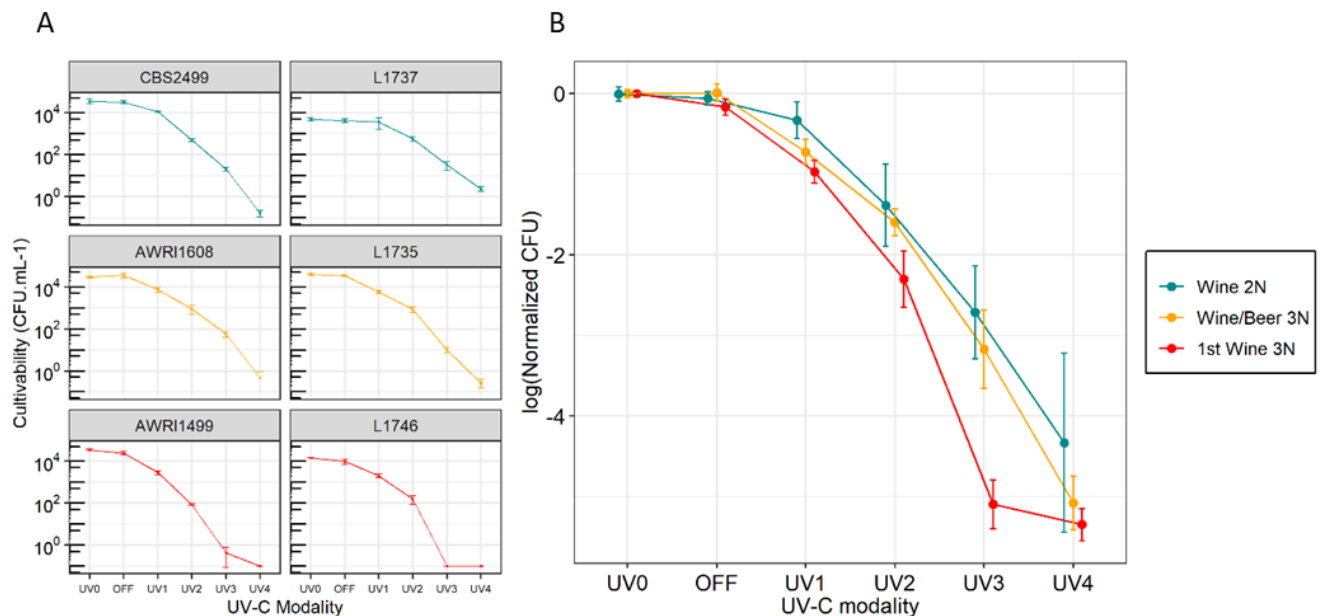


Figure 39 : Survival curves of *B. bruxellensis* strains for UV-C treatment in red wine.

Cultivability is expressed in CFU.mL⁻¹ (A). Normalized survival curves of *B. bruxellensis* depending on the genetic groups of the strains (B). For each measure, CFU.mL⁻¹ were normalized to the mean of the corresponding UV0 modality (Normalized CFU), the mean of triplicates +/- standard errors were represented for each modality. UV0 correspond to the wine samples collected before UV-C treatment, OFF correspond to four cycles in the pilot with lamps turned off and UV1, UV2, UV3, UV4 after one, two, three and four cycles (UV1 = 1656 J.L⁻¹, UV2 = 3312 J.L⁻¹, UV3 = 4968 J.L⁻¹, and UV4 = 6624 J.L⁻¹). The colours correspond to the genetic groups of the strains. L1737, L1735, L1746 stand for CRBO L1737, CRBO L1735 and CRBO L0423 respectively.

UV3 treatment (4968 J.L⁻¹) was enough to achieve 4.70 and 5.17 log₁₀ reduction for AWRI1499 and L1746 strains (1st Wine 3N sulphite resistant) respectively, resulting in populations lower than 1 CFU.mL⁻¹. UV4 (6624 J.L⁻¹) treatment was required to achieve the same level of population (<1 CFU.mL⁻¹) for CBS2499, AWRI1608 and L1735 strains with respectively 5.33, 4.97 and 5.18 log₁₀ reduction. L1737 strain was the only one which did not achieve a cell population lower than 1 CFU.mL⁻¹ even after UV4 treatment and with the lowest initial cell population.

Considering the genetic groups of the strains (Figure 39 B), the 1st Wine 3N group (L1746 and AWRI1499) was the more sensitive to UV-C treatment, the Wine 2N group (CBS2499 and

L1737) was the less sensitive to UV-C while the Wine/Beer 3N group (AWRI1608 and L1735) was found to be intermediary.

II.4. Discussion

II.4.1. Surface and liquid assays are complementary approaches to assess the impact of UV-C

The present study aimed to evaluate the sensitivity to UV-C treatment of yeast species related to winemaking with a focus on *B. bruxellensis* species. For this, a large plate screening method was developed to test 147 strains of 14 different species with a focus on *B. bruxellensis* (104 strains). We then confirmed the impact of UV-C treatment in red wine. Due to practical constraints (100 L of wine necessary for 6 strains), only strains of *B. bruxellensis*, the main wine spoiler, were tested. Regarding plate screening method, all the tested species were significantly impacted by increasing UV-C doses. The number of cells *per* drop was also a significant factor indicating an impact of the initial cell densities. The density effect could be explained by a shadowing effect, the cells acting as absorbance particles and decreasing UV-C transmittance. This cell density impact was also observed in grape must (Diesler et al. 2019a). The impact of UV-C treatment was congruent with previous studies at similar UV-C doses (Pulschen et al. 2015; Longan et al. 2017; Kim, Kim, et Kang 2017). Surface UV-C assays revealed strong difference of sensitivity between wine species. Similar results were obtained in apple juice: *S. cerevisiae* and *Z. bailii* were less sensitive than *B. bruxellensis* and *B. anomalus* (Gouma et al. 2015). Moreover, the surface plate screening revealed intraspecific variation within *B. bruxellensis*, which was confirmed by our liquid trials. Although our plate screening did not allow the determination of the log reduction after treatment, it allowed the screening of a large number of species (14 yeasts) and strains (147 distinct isolates), unachievable with liquid assays. Moreover, UV-C surface treatment could be useful for oenological equipment disinfection and such plate-screening approach is pertinent to assess its relevance. The UV4 modality (6624 J.L⁻¹) achieved the reduction of cell population lower than 1 CFU.mL⁻¹ except for L1737 strain. Those results confirmed the efficiency of UV-C treatment even for a very absorbent red wine ($\alpha_{254} = 31.6 \text{ cm}^{-1}$) contaminated by high populations (10⁴ CFU.mL⁻¹) of *B.*

bruxellensis and valid our large plate screening and data analysis approach as an efficient tool for the assessment of a control method.

II.4.2. Wine yeast species show strong sensitivity variation to UV-C treatments

Although all yeast species showed sensitivity to UV-C, strong interspecies variations were observed within the dose range used. Numerous hypotheses can be made to explain interspecific sensitivity variation. Secondary metabolites such as photoprotective pigments (carotenoid, melanin) or mycosporine-like amino acids (MAAs) are known to protect from UV-C radiation in bacteria and fungi (Y. Wang et Casadevall 1994; Gao et Garcia-Pichel 2011; Pulschen et al. 2015; Blachowicz et al. 2020; Singaravelan et al. 2008; Libkind et al. 2009). The UV-C radiation is known to impact DNA by creating CPDs (Cyclobutane Pyrimidine Dimers) leading to the non-transcription and non-replication of DNA, ultimately inducing deformation of the DNA helix and occasioning double strand breaks (Ikehata et Ono 2011). DNA damages caused by UV-C treatment were shown to be the primary factors affecting microorganism death (Kim, Kim, et Kang 2017). To repair CPDs, two DNA repair mechanisms are described, the photoreactivation performed by photolyases (Fernández Zenoff, Siñeriz, et Farías 2006; M. Zhang, Wang, et Zhong 2017) and the Nucleotide Excision Repair (NER) (Yu et al. 2011). The first mechanism is highly species dependent, with some species lacking photolyase genes (Lucas-Lledó et Lynch 2009; Mei et Dvornyk 2015) indicating a low selective pressure on this function. Subsequent works will be necessary to identify the molecular mechanism(s) explaining variation in UV-C sensitivity amongst wine yeast species.

Among the considered species, *Schizo. pombe*, *M. pulcherrima* and *Starm. bacillaris* were found to be the less affected by UV-C radiations. *L. thermotolerans*, *S. uvarum*, *T. delbrueckii*, *H. uvarum* and *S. cerevisiae* exhibited an intermediary phenotype while *Z. bailii*, *Z. rouxii*, *B. bruxellensis*, *T. cantarellii* and *B. anomalus* presented the most sensitive phenotype. Our results are mostly in accordance with a previous study reporting that *M. pulcherrima* was less sensitive than *S. cerevisiae* and *H. uvarum*, and was still viable after 1.0 kJ.L⁻¹ UV-C dose in red must (Diesler et al. 2019a). The same authors showed that *S. cerevisiae* and *H. uvarum* sensitivities in grape must were similar and resulted in a total loss of detectable cultivability with 600 J.L⁻¹ of UV-C dose.

Interestingly, some of the less sensitive species (*Schizo. pombe*, *Starm. bacillaris*, *M. pulcherrima*) are known to be vineyard resident, frequently isolated from grapes or other fruit surfaces (Sipiczki 2016; Tristezza et al. 2013; Masneuf-Pomarede et al. 2015; C. Wang et al. 2015). Intermediate species (*L. thermotolerans*, *S. uvarum*, *T. delbrueckii*, *H. uvarum* and *S. cerevisiae*) are ubiquitous, frequently isolated from vineyards but also from the cellar environment (fermentative grape must, wine, equipment, etc.)(Sipiczki 2016; van Breda, Jolly, et van Wyk 2013; Albertin et al. 2014; Tristezza et al. 2013; Zott et al. 2008; C. Wang et al. 2015; Goddard et Greig 2015). By contrast, the more sensitive species (*Z. bailii*, *Z. rouxii*, *B. bruxellensis*, *T. cantarellii* and *B. anomalus*) are mainly cellar resident, adapted to wine and/or to anthropic environments and scarcely isolated from grapes or natural environments (Zuehlke, Petrova, et Edwards 2013; Oro et al. 2019; Portugal et al. 2015). On earth, stratospheric ozone layer absorbs UV-C radiation and terrestrial UV radiations are mostly composed of UV-A and UV-B that can create the same types of damages (Sinha et Häder 2002a). These UV radiations are known to influence and modulate yeast community composition on grapes (Valero et al. 2007; Longan et al. 2017). A weaker selective pressure on UV-C tolerance mechanisms at cellar scale could explain from an evolutionary viewpoint the differences between wine yeast species. Beside *Saccharomyces* species used to control and complete wine alcoholic fermentation, none conventional yeasts (*T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* and *M. pulcherrima*) can be used as technological auxiliaries by winemakers for a wide range of applications as acidification, biocontrol agent or to improve aromas (Roudil et al. 2019). It could be interesting to evaluate the impact of UV-C treatment in mix-inoculated wine or must on yeasts spoilers and auxiliaries in order to target specifically unwanted ones. In any case, this observation highlights the potentiality of UV-C treatment to eliminate cellar resident species, found on oenological equipment and in wines.

II.4.3. *B. bruxellensis* species show low but significant intraspecific variations to UV-C sensitivity

Regarding *B. bruxellensis*, which is highly sensitive to UV-C treatment, some intraspecific variability, low yet significant, was recorded. *B. bruxellensis* is known to be phenotypically versatile. When focusing on the main genetic groups associated with wine, the 1st Wine 3N group is the more sensitive to UV-C, followed by Wine/Beer 3N and Wine 2N. Comparable results were obtained in our red wine trials. Some of *B. bruxellensis* strains were shown to be

resistant to sulphite addition in wine (Curtin et al. 2012; Varela et al. 2019). Recently, a study linked this peculiar ability to a specific genetic group, 1st Wine 3N (Avramova et al. 2019). This group being the most sensitive to UV-C treatment in both surface and liquid trials, UV-C stabilization could emerge as a pertinent method to control *B. bruxellensis* in winemaking.

B. bruxellensis is a diplo-triploid species complex, resulting in diploid and triploid (comprising diploid genome and one divergent haploid genome). Polyploidy can be involved in UV-C sensitivity, by increasing the redundancy of essential genes, increasing the cell volume and organelles. In *S. cerevisiae*, it was shown that polyploids as a better survival rates compared to diploid with UV-C treatment (Lidzbarsky, Shkolnik, et Nevo 2009; Sasaki 1992). In our case, the triploids strains (that have probable hybrid origin) belong to the more sensitive genetic groups (1st Wine 3N, Wine/Beer 3N). We can hypothesize that interspecific hybrids have less-efficient repair systems due to the combination of divergent genomes, resulting in accrued UV-C sensitivity.

II.5. Conclusion

The main yeast species encountered in winemaking were compared with respect to their sensitivity to UV-C radiation first with a plate screening approach. Strong interspecific variation was observed. Interestingly, UV-C sensitivity was associated with the ecological niche of the yeast species, with the cellar resident species being more sensitive to UV-C treatment than the vineyard-resident ones. Amongst spoilers, *B. bruxellensis* was highly sensitive to UV-C compared to other species. Intraspecific variability was observed, depending on genetic groups and was confirmed in liquid trials. The strains from the 1st Wine 3N genetic group were more sensitive compared to the strains from the Wine/Beer 3N and Wine 2N groups. Indeed, 1st Wine 3N strains required 25 % less energy than other strains to achieve 5 Log₁₀ reduction. Strains from this group were shown to be sulfite tolerant/resistant, thus, this supports the interest of UV-C treatment in wine context. Overall, wine treatments were effective, proving that UV-C could be used to control *B. bruxellensis* even at high levels of cell population and in absorbent red wine.

In general, this process applications in oenology are numerous. UV-C treatment could occur at different steps of the winemaking process. It could be used before inoculation, for wine mutage, to block malolactic fermentation, to ensure microbiological stability during the aging

of wine and finally just before bottling. This study does not address the possible wine modification induced by the process but additional work is underway to characterize the impact on organoleptic qualities at UV-C doses required for microbiological stabilization of both red and white wines. Diesler et al. (2019) addressed this subject revealing a possible modification of the volatile composition with the loss of certain terpenes and C13-noripenoids (in Riesling, Müller-Thurgau, Pinot blanc and Pinot noir treated musts and corresponding wines). Yet, sensory properties did not differ significantly. Off-flavor only occurred at an UV dose tenfold higher than relevant for microbiological stabilization (more than 18 kJ.L^{-1}). This study also addressed the possible impact of the treatment on wine microorganisms and consumer's safety, showing no mutagenic effect or toxicity of the process even with UV doses tenfold higher than relevant. Also, to the best of our knowledge, no study evaluated the impact of UV-C treatment on the ability of yeasts or bacteria to perform fermentation or to act as spoilage after "sub-lethal" exposition to UV-C.

III. Conclusion générale

La méthodologie mise au point pour cette étude a permis le criblage sur milieu solide de la sensibilité au rayonnement UV-C de 147 souches de levures fréquemment identifiées dans l'environnement vitivinicole. Grâce à cette méthode un important jeu de données a pu être généré rapidement et des résultats satisfaisants ont pu être obtenus sur un nombre important de souches de levures. Cependant, cette méthode présente certaines limites, elle ne permet pas de déterminer la réduction logarithmique obtenue suite aux traitements et ne permet pas d'estimer directement les doses UV-C requises pour la stabilisation microbiologique des différents microorganismes dans le vin.

Au regard des résultats obtenus avec cette approche, nous pouvons dans un premier temps noter que l'ensemble des espèces étudiées ont été impactées suite à l'exposition au rayonnement UV-C. Différents facteurs pouvant jouer sur l'efficacité du procédé ont été observés. Premièrement, sans surprise, pour l'ensemble des souches étudiées, le niveau d'impact du rayonnement UV-C sur les cinétiques de croissance est fortement corrélé à l'intensité du traitement qui semble être le facteur le plus important. Un second facteur clé est le niveau de population, simulé dans cette étude par les différentes densités cellulaires déposées pour chaque souche. Les résultats montrent en effet, que l'efficacité du traitement

sur l'ensemble des souches étudiées diminue avec l'augmentation des niveaux de populations. Cette observation pourrait s'expliquer par un effet bouclier ou « shadowing effect » grâce auquel certaines cellules sont protégées du rayonnement par d'autres cellules grâce à des phénomènes d'agrégation ou une densité cellulaire très importante. Enfin, les résultats ont démontré une variabilité importante vis-à-vis de la sensibilité au rayonnement UV-C parmi les espèces et souches de levures sélectionnées. En effet, même si l'ensemble des levures étudiées ont exprimé une sensibilité aux traitements UV-C, de fortes variations interspécifiques dans la réponse aux différents traitements ont été observées.

Schizo. pombe, *M. pulcherrima* et *Starm. Bacillaris* ont démontré une sensibilité significativement moins importante que le reste des souches étudiées. *L. thermotolerans*, *S. uvarum*, *T. delbrueckii*, *H. uvarum* et *S. cerevisiae* ont présenté un niveau de sensibilité intermédiaire tandis que *Z. bailii*, *Z. rouxii*, *B. bruxellensis*, *T. cantarellii* et *B. anomalus* ont exprimé les niveaux de sensibilité les plus importants.

Les espèces les moins sensibles (*Schizo. pombe*, *Starm. Bacillaris* et *M. pulcherrima*) sont principalement connues pour être résidentes des vignobles car fréquemment isolées sur les baies de raisins ou sur d'autres fruits. Les espèces intermédiaires (*L. thermotolerans*, *S. uvarum*, *T. delbrueckii*, *H. uvarum* et *S. cerevisiae*) sont ubiquitaires, fréquemment identifiées dans les vignobles, mais aussi de l'environnement de vinification (moût de raisin fermenté, vin, équipement œnologique...). En revanche, les espèces les plus sensibles (*Z. bailii*, *Z. rouxii*, *B. bruxellensis*, *T. cantarellii* et *B. anomalus*) résident principalement dans les chais, sont adaptées au vin et/ou aux environnements anthropiques et ne sont que très rarement isolées au vignoble. Cette variabilité interspécifique pourrait s'expliquer par la capacité plus ou moins importante des différentes espèces à se protéger du rayonnement UV-C ainsi que la capacité à réparer les dommages induits par l'interaction du rayonnement avec l'ADN. Des métabolites secondaires tels que les pigments photoprotecteurs (caroténoïde, mélanine) ou les acides aminés de type mycosporine sont notamment connus pour leur action protectrice vis-à-vis du rayonnement UV terrestre chez les bactéries et les champignons. La capacité à produire certains de ces métabolites pourrait donc conduire à une diminution de la sensibilité au rayonnement UV. De la même manière, la présence ou l'absence de certains mécanismes de réparation de l'ADN (photoréactivation et dark-repair), ainsi que des niveaux d'expression plus ou moins importants entre les différentes espèces pourraient expliquer des niveaux de

sensibilités variables entre ces dernières. Enfin, la capacité à former des amas cellulaires pourrait être un élément supplémentaire conférant une sensibilité moins importante au rayonnement (effet bouclier).

En considérant que les radiations UV terrestres (principalement composées d'UV-A et d'UV-B) peuvent créer des dommages similaires à ceux induits par le rayonnement UV-C, il semble envisageable que l'exposition au rayonnement solaire induise une pression sélective favorisant l'acquisition, le maintien et l'amélioration des mécanismes de protection cités précédemment. Ainsi, cela pourrait être un élément de réponse afin d'expliquer les niveaux de sensibilité plus faible chez les espèces identifiées au vignoble et inversement, le niveau de sensibilité plus élevé chez les levures principalement identifiées au cours de la vinification.

Cependant, des travaux ultérieurs et plus complets seront nécessaires pour identifier le ou les mécanismes moléculaires expliquant la variation de la sensibilité aux UV-C parmi les espèces de levures de vin. Dans tous les cas, ces résultats montrent que les traitements UV-C permettent plus facilement de manager les espèces résidentes dans l'environnement de vinification, présentes sur le matériel œnologique et dans les vins.

L'ensemble des souches de *B. bruxellensis* ont exprimé un niveau de sensibilité élevé au traitement UV-C. De plus, une variabilité intraspécifique faible, mais significative a pu être observée. Les souches appartenant au groupe génétique « 1st Wine 3N », connues pour leur tolérance au SO₂ ont exprimé une sensibilité significativement plus importante aux traitements UV-C que les souches appartenant aux autres groupes génétiques étudiés (Wine/Beer 3N et Wine 2N). Cette variation intraspécifique a été confirmée sur 6 souches dans le cas de traitement de vin rouge en utilisant un pilote développé au laboratoire. Nous avons constaté qu'une dose de 6624 J.L⁻¹ permettait une réduction de 5 log₁₀ pour 5 des 6 souches étudiées. Cette modalité a permis la diminution des populations en dessous de 1 CFU.mL⁻¹, sauf pour la souche L1737. Les résultats confirment l'efficacité du traitement UV-C même pour un vin rouge très absorbant ($\alpha_{254} = 31.6 \text{ cm}^{-1}$) contaminé par des populations élevées (10⁴ CFU.mL⁻¹) de *B. bruxellensis*. Pour être plus précis et à titre de comparaison, les souches « 1st Wine 3N » ont nécessité des doses 25 % moins importantes que les autres souches pour obtenir une réduction de 5 log₁₀. Les souches de ce groupe sont connues pour des niveaux importants de tolérance aux sulfites, ce qui confirme le potentiel des UV-C pour la gestion des levures d'altérations. Ce groupe étant le plus sensible au traitement par UV-C dans les essais

sur milieu solide et dans le vin, la stabilisation par UV-C pourrait apparaître comme une méthode pertinente et complémentaire pour manager les populations de *B. bruxellensis* notamment dans le contexte d'émergence de souches tolérantes/résistantes au SO₂.

Enfin, les résultats communs obtenus sur milieu solide et dans le vin (même si cela ne concerne qu'une petite partie des souches étudiées) confirment que l'approche de criblage sur milieu solide est un outil pertinent pour évaluer la sensibilité d'un microorganisme.

Malheureusement, le suivi de l'évolution des populations de *B. bruxellensis* dans les vins n'a pas pu être réalisé. De plus, cette étude ne traite pas de la possible modification du vin induite par le procédé, mais des travaux complémentaires ont été réalisés afin de caractériser l'impact sur de traitements équivalents sur les qualités organoleptiques de vins rouges.

CHAPITRE IV : Étude de la variabilité intra et interspécifique vis-à-vis de la sensibilité au traitement par LP de levures identifiées dans l'environnement vitivinicole

I. Introduction générale

La lumière pulsée (LP) est une technologie athermique déjà utilisée dans des domaines variés. Ce procédé repose sur l'application d'impulsions de courte durée (flash de l'ordre de la μs) d'une lumière intense couvrant un large spectre d'émission (200 à 1100 nm). Ce spectre comprend l'ultraviolet (UV) : 200 à 400 nm, la lumière visible (VIS) : 400 à 700 nm et la région du proche infrarouge (IR) : de 700 à 1 100 nm. Le procédé de lumière pulsée est souvent considéré comme plus efficace que le rayonnement UV-C en raison de sa puissance de crête plus élevée et de son spectre d'émission large qui induit différents effets germicides (photochimique, photothermique et photophysique). Toujours dans l'optique de favoriser l'émergence de nouveaux procédés de stabilisation microbiologique, dans cette partie un travail sur l'évaluation du potentiel de la LP pour la filière vitivinicole a été entamé. Peu d'études se sont intéressées à l'application de ce procédé innovant en œnologie. On trouve dans la littérature un grand nombre de résultats concernant l'utilisation de la LP pour la stabilisation microbiologique de produits alimentaires liquides et solides, cependant, ces études se sont principalement intéressées à l'inactivation de pathogènes et de moisissures. À l'heure actuelle peu de résultats portent sur la sensibilité des levures au traitement par LP, encore moins en ce qui concerne les espèces de levures fréquemment identifiées au cours de la vinification. C'est pourquoi le premier objectif de cette partie concerne l'évaluation des niveaux de sensibilité de différentes souches et espèces de levures fréquemment identifiées en œnologie, mais aussi l'éventuelle identification d'une ou plusieurs espèces présentant une résistance particulière à ce procédé. 198 souches réparties parmi quatorze espèces de levures ont été sélectionnées. Parmi ces levures, une attention particulière a été portée à l'espèce *B. bruxellensis* (111 souches parmi les 198 sélectionnées).

Un second objectif de cette partie concerne la caractérisation des paramètres opérationnels les plus importants. Contrairement au procédé UV-C, l'intensité des traitements par LP peut être modulée via différents paramètres tels que la fluence totale ($\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$), la fluence par flash ($\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$), la fréquence de traitement (Hz ou s^{-1}) mais aussi le nombre de flash. À partir de ces différents paramètres, il est possible de distribuer une même quantité de rayonnement de différentes façons. Grossièrement, pour un traitement à une fluence totale donnée (nombre de flash* fluence par flash), il est possible d'appliquer soit un nombre important de flashes avec une fluence par flash peu élevée, soit seulement quelques flashes avec une fluence par flash

élevée. Au total, 15 modalités de traitement ont été sélectionnées afin de pouvoir déterminer l'importance relative des paramètres opérationnels suivants : la fluence totale, la fluence par flash, la fréquence de traitement. Pour chacune des souches étudiées, une cinétique de croissance a été obtenue en réponse à chacun des 15 traitements appliqués. La comparaison des cinétiques de croissance des 198 souches étudiées suite aux différents traitements appliqués doit apporter des éléments de réponse sur la variabilité du niveau de sensibilité à la LP entre ces levures mais aussi sur les conditions de traitement permettant une efficacité optimale du procédé.

Dans cette partie, l'approche méthodologique de suivi de croissance après traitement et le procédé d'intégration des données sont similaires à ceux développés pour l'évaluation des niveaux de sensibilités de levure aux UV-C (Figure 40 : Schéma du protocole d'étude de la diversité spécifique vis-à-vis de la sensibilité à la lumière pulsée).

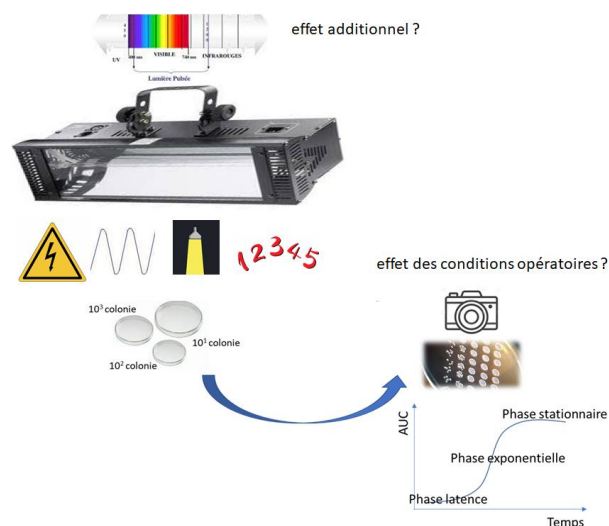


Figure 40 : Schéma du protocole d'étude de la diversité spécifique vis-à-vis de la sensibilité à la lumière pulsée

En parallèle, des essais de stabilisation microbiologique en traitement continu ont été réalisés. Neuf souches de levures (6 souches de *B. bruxellensis*, 2 souches de *S. cerevisiae* et une souche de *L. thermotolerans*) ont été inoculées séparément dans différents lots d'un vin rouge afin d'évaluer les doses nécessaires à l'inactivation des différentes espèces de levure et de valider la variabilité observée par criblage sur milieu solide. À notre connaissance il s'agit du premier essai de stabilisation microbiologique par LP d'un vin rouge fortement contaminé par différentes souches de levure et plus particulièrement par *B. bruxellensis*. Les résultats présentés dans cette partie sont en cours de soumission auprès du journal Food Microbiology.

II. Présentation des résultats

Wine yeast species show strong inter- and intra-specific variability in their sensitivity to pulsed light

Jules Harrouard¹, Etienne Pilard¹, Cécile Miot-Sertier¹, Lena Pouget¹, Philippe Marullo^{1,2}, Giovanna Ferrari⁴, Gianpiero Pataro⁴, Rémy Ghidossi¹ and Warren Albertin^{1,3}

¹ Univ. Bordeaux, ISVV, Unité de Recherche Œnologie EA 4577, USC 1366 INRAE, Bordeaux INP, F-33882 Villenave d'Ornon, France.

² Biolauffort, 11 Rue Aristide Bergès, F-33270 Floirac, France.

³ ENSCBP, Bordeaux INP, F-33600 Pessac, France

⁴ Unisa, Via Giovanni Paolo II, 132, 84084 Fisciano SA, Italia

Abstract:

While the trend in winemaking is toward reducing the inputs and especially sulphites utilization, emerging technologies for the preservation of wine is a relevant topic for the industry. Amongst yeast spoilage in wine, *Brettanomyces bruxellensis* is undoubtedly the most feared. In this study, pulsed light (PL) treatment is investigated. A first approach was conducted using a drop-platted system to compare the sensitivity of various strains and to evaluate the impact of three operational parameters: the fluency per flash, the total fluency and the flash frequency. 198 strains distributed amongst fourteen yeast species related to wine environment were assessed for various PL treatments. An important variability in UV-C response was observed at the interspecific level. A focus on *B. bruxellensis* strains highlighted a stronger sensitivity to PL for this species, with intraspecific variation. Fluency per flash appeared to be a key parameter prior to total fluency thus demonstrating the importance of the peak effect during PL treatments. In a second approach, red wine batches inoculated with 9 strains from *B. bruxellensis*, *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* were processed in a closed flow through reactor. Results confirmed both the various sensitivities observed previously and the higher sensitivity of *B. bruxellensis* species to PL. In this study, wine treatments with an estimated total fluency of 22.8 J.cm⁻² resulted in more than 6 log reduction for different *B. bruxellensis* strains. These results highlight the potential of PL for wine microbial stabilization. Further work needs to be realized in order to evaluate the impact of such treatments on wine's organoleptic properties.

Keywords: Pulsed light, yeast, microbial stabilization, *Brettanomyces bruxellensis*, red wine

II.1. Introduction

Wide varieties of food preservation methods are available including heating, freezing, filtration and addition of preservatives. However, these methods are cost effective and can impair food quality and therefore major efforts have been made to develop alternative technologies with a lower impact on food quality (Morales-de la Peña, Welti-Chanes, et Martín-Belloso 2019). Pulsed light (PL) is a non-thermal technology used to decontaminate surfaces or liquid by inactivating microorganisms using short-time pulses of an intense broad-spectrum light (for review: (Elmnasser et al. 2007; Oms-Oliu, Martín-Belloso, et Soliva-Fortuny 2010; Kramer, Wunderlich, et Muranyi 2017a; John et Ramaswamy 2018; Mandal, Mohammadi, Wiktor, Singh, et Singh 2020)). PL relies on a wide wavelength range of 200–1100 nm, which includes ultraviolet (UV): 200–400 nm, visible light (VIS): 400–700 nm, and near-infrared region (IR): 700–1100 nm. PL treatment is based upon the accumulation of high discharge voltage in a capacitor where the stored energy is delivered in short pulses through a light source filled with xenon gas. This xenon-light source emits a broad-spectrum light flash (typically 1 to 10 pulses per second) with approximately 25 % in the UV range (Keener et Krishnamurthy 2014). Cells are inactivated by photochemical damage of DNA mainly caused by UV wavelengths, enhanced by photothermal effect composed of local overheating and photophysical effect on proteins and membranes (Ikehata et Ono 2011; Elmnasser et al. 2007). The last mechanism is responsible for membrane disruption and vacuole extension observed in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and bacteria cells (*Bacillus subtilis*) (Kazuko Takeshita et al. 2003a; Nicorescu et al. 2013; Ferrario et Guerrero 2017). Although those three mechanisms can contribute synergistically to the microbial inactivation action of PL, the photochemical effect due to the UV wavelength is considered as the main responsible for the germicidal effect of this process. Many researchers consider that PL disinfection is more efficient than UV irradiation due to its high peak power (Bohrerova et al. 2008). The main parameters governing PL efficiency are the fluency ($\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$) over exposure time (s), the frequency (Hz), the number of pulsed applied (n), the pulsed width (τ) and the peak power (W) (Barbosa-Canovas et al. 2000).

Since the first work on disinfection with flash lamps were performed in the late 1970s in Japan, PL has been explored in various fields such as packaging and processing equipment, food, air treatment, water treatment and medical devices as well as various surface treatments (Pataro

et al. 2011a; Levy et al. 2012; Hwang, Cheigh, et Chung 2015; Aguirre et al. 2014; Proulx et al. 2017; Ferrario et Guerrero 2017).

This innovative non-thermal control method is starting to be evaluated in oenology. Red grape PL treatment has been carried out, reducing the microbial density (e.g. yeast and bacteria) on grape surfaces, about $1.2 \log_{10} \text{CFU.mL}^{-1}$ with 10.7 J.cm^{-2} (Escott et al. 2017; 2021), on red grape juice as well with a reduction of $4.89 \log_{10} \text{CFU.mL}^{-1}$ of *Escherichia coli* (Xu et al. 2019). During winemaking, yeasts management is essential to ensure good fermentations and to limit the risk of organoleptic deviations. Indeed, while *Saccharomyces* yeasts are essential for must fermentation, some species are considered as spoilers (e.g., *Brettanomyces bruxellensis*, *B. anomalus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Z. bailii*, *Trigonopsis cantarellii*, etc.). Those species are able to affect the fermentation kinetics, to produce off-flavors and to modify wine's physical properties which result in a lower quality of the final product (Loureiro et Malfeito-Ferreira 2003b; Padilla, Gil, et Manzanares 2016). Among them, *Brettanomyces bruxellensis* is certainly the most feared spoiler, damaging up to 25% of the world red wine production (Alston et al. 2021; Romano et al. 2008; Oro et al. 2019). *B. bruxellensis* yeasts are able to produce volatile phenols such as 4-vinylphenol, 4-vinylguaiacol, 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol, whose aromatic notes are unpleasant and described as animal, leather, horse, stable or pharmaceutical (Chatonnet et al. 1992a; Loureiro et Malfeito-Ferreira 2003b; Oelofse, Pretorius, et Toit 2008; Schopp et al. 2013). Several recent studies have shown both high genetic and phenotypic diversity of *B. bruxellensis* in different wine regions (Avramova, Cibrario, et al. 2018; Cibrario et al. 2020; Gounot et al. 2020; Eberlein et al. 2021). This important diversity is reflected in the relative sensitivity of different strains to existing microbial stabilization methods used during winemaking. For instance, genetic groups resistant to sulfite addition (Avramova, Vallet-Courbin, et al. 2018), or expressing lower sensitivity to chitosan (Paulin et al. 2020) or to UV-C treatment (Pilard et al. 2021) have been identified. Preliminary results on wine microbial stabilization with PL were obtained in white wine with a maximal reduction of 2.10 log of *B. bruxellensis* (Pérez-López et al. 2020b). Authors consider that PL could be interesting for the wine industry for controlling the risk associated with *Brettanomyces* contamination.

We propose, in this research, to investigate the PL sensitivity of various oenological yeasts with a focus on *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to identify inter-

and intra-specific variability. This study explores the dose-effect relationship between PL total fluency, fluency per flash, frequency and inactivation of microorganisms naturally present in wine. A plate-based screening approach was applied to a large collection of yeast species and strains (14 species and 198 strains). Different PL modality treatments (with varying fluency per flash, frequency and total fluency) were considered and the variability within *B. bruxellensis* and *S. cerevisiae* was compared. In a second step, we selected six *B. bruxellensis*, two *S. cerevisiae* and one *L. thermotolerans* strains in order to evaluate PL potential to inactivate those yeasts in a highly absorbent red wine. In this part, the inoculated red wine was PL treated with several treatment intensities using a lab-made continuous flow PL apparatus.

II.2. Materials and methods

II.2.1. Yeast strains

The 198 strains from 14 species used in this study were collected from different laboratories or collections (Tableau 11). Strains were grown and maintained in YPD plates at 24°C (10 g.L⁻¹ yeast extract, 10 g.L⁻¹ peptone, 20 g.L⁻¹ glucose, 20 g.L⁻¹ agar). These species were retained for their relevance in the winemaking process.

Tableau 11 : List of the strains used in this work.

Species	LISTS
<i>B. anomalus</i>	<u>3 strains</u> : BR 23-4 ; CLIB 304 ; NRRL Y-17522 T <u>Wine 2N - 34 strains</u> : 1961_MX_M1_E2 ; CBS 2499 ; ISA2150 ; CRBO L0469 ; CRBO L0614 ; CRBO L14163 ; CRBO L1703 ; CRBO L17111 ; CRBO L1714 ; CRBO L1715 ; CRBO L1727 ; CRBO L1751 ; YJS5302 ; YJS5319 ; YJS5320 ; YJS5345 ; YJS5347 ; YJS5357 ; YJS5373 ; YJS5385 ; YJS5392 ; YJS5416 ; YJS5422 ; YJS5426 ; YJS5440 ; YJS5447 ; YJS5449 ; YJS5453 ; YJS5456 ; YJS5458 ; YJS5461 ; YJS5463 ; YJS5479 ; YJS5485 <u>Wine/Kombucha 2N - 19 strains</u> : 15_1 ; ISA1601 ; YJS5301 ; YJS5310 ; YJS5334 ; YJS5340 ; YJS5344 ; YJS5349 ; YJS5363 ; YJS5368 ; YJS5384 ; YJS5398 ; YJS5402 ; YJS5406 ; YJS5407 ; YJS5413 ; YJS5417 ; YJS5420 ; YJS5431 <u>Wine/Beer 3N - 25 strains</u> : 2OT13_05 ; 2OT13_07 ; 2OT14_01 ; 2OT14_03 ; AWRI1608 ; CDR222 ; GB62 ; ISA2397 ; CRBO L0417 ; CRBO L14155 ; CRBO L14194 ; CRBO L17112 ; CRBO L1741 ; CRBO L1749 ; CRBO L1771 ; LB15107g ; LB15110g ; MLC_296_2014_9 ; NL045 ; NL059 ; VP1519 ; YJS5396 ; YJS5397 ; YJS5400 ; YJS5454 <u>1st Wine 3N - 19 strains</u> : 12_LT_VGC3_c_10 ; 2OT13_02 ; 33_2 ; AWRI1499 ; CDR217 ; GB12 ; GSP1509 ; CRBO L14174 ; CRBO L14175 ; NL050 ; YJS5408 ; YJS5434 ; YJS5445 ; YJS5459 ; YJS5469 ; YJS5473 ; YJS5476 ; YJS5478 ; YJS5487 <u>Tequila/bioethanol 3N - 6 strains</u> : CBS 5512 ; CBS 6055 ; CRBO L14169 ; CRBO L17108 ; SJ12_4 ; UWOPS_92_298_4 <u>2nd Wine 3N - 8 strains</u> : ISA2211 ; CRBO L0308 ; CRBO L14190 ; CRBO L1733 ; CRBO L1782 ; VP1539 ; VP1544 ; YJS5382
<i>B. bruxellensis</i>	
<i>H. uvarum</i>	<u>3 strains</u> : CRBO L1433 ; NZ15 ; Y-1614
<i>L. thermotolerans</i>	<u>3 strains</u> : 18 ; AEB ; CLIB292
<i>M. pulcherrima</i>	<u>3 strains</u> : CRBO L0675 ; NZ268 ; Y-7111 <u>Beer - 10 strains</u> : 227 ; 382 ; 650 ; Nottingham ; premium gold ; S-04 ; US-56 ; Windsor ; Y7327 ; Y7328 <u>Bread - 10 strains</u> : 215 ; 319 ; 324 ; 646 ; Hironnelle ; SBA ; SBB ; SBC ; SBD ; SBE <u>Dist - 5 strains</u> : A24 ; alcotec 48 ; Y-963 ; YB-427 ; YB-428 <u>Food - 2 strains</u> : Y-767 ; YB-360 <u>Fruit - 5 strains</u> : Y-6678 ; Y-7568 ; Y-965 ; YB-210 ; YB-4081 <u>Fruit juice - 4 strains</u> : Y-129 ; Y-2230 ; Y-6275 ; Y-6278 <u>Nature - 2 strains</u> : Y-35 ; Y-7567
<i>S. cerevisiae</i>	

Wine - 13 strains : 154 ; 157 ; 328 ; 479 ; Fx 10 ; GN ; CRBO L0431 ; CRBO L0432 ; CRBO L0433 ; CRBO L0437 ; SB ; X5 ; Y-1301

<i>S. uvarum</i>	<u>2 strains</u> : U1 ; U3
<i>Sc x Su</i>	<u>2 strains</u> : DU23 ; EU23
<i>Schizo. pombe</i>	<u>3 strains</u> : CRBO L0442 ; Y-11791 ; Y-12796
<i>Starm. bacillaris</i>	<u>3 strains</u> : 10_372 ; CRBO L0473 ; NZ12
<i>T. delbrueckii</i>	<u>3 strains</u> : B172 ; CLIB 230 ; CRBO L0705
<i>Tri. cantarellii</i>	<u>3 strains</u> : CRBO L0412 ; CRBO L0416 ; CRBO L0419
<i>Zygo. bailii</i>	<u>2 strains</u> : CLIB 213 ; CRBO L0536
<i>Zygo. rouxii</i>	<u>2 strains</u> : CLIB 233 ; CRBO L0314

II.2.2. PL treatment of yeast on YPD solid medium

Strains were grown in liquid media (YPD 10 g.L⁻¹ yeast extract, 10 g.L⁻¹ peptone, 20 g.L⁻¹ glucose) for 24 hours and the population was estimated by optical density (FLUOstar Omega, MNGLabtech, France). Droplets of 2 µl of serial dilutions (0.5, 0.05, 0.005 and 0.0005 DO) were spotted onto solid medium (YPD), aiming at 4 different densities (around 1000, 100, 10, 1 CFU.drop⁻¹) corresponding to concentrations around 10⁶, 10⁵, 10⁴ and 10³ cells.mL⁻¹. Drops were performed in triplicate for each condition. Spotted plates were then placed in a LP.Box (Sanodev, France), 30 cm under the flash lamp and treated with different modalities. (Tableau 12).

Tableau 12 : List of the 15 modalities of PL used for the plate screening.

Modality	Lamp Voltage (V)	Fluency/Flash (mJ.cm ⁻²)	Flash Number	Treatment Time (s)	Frequency (Hz)	Total Fluency (mJ.cm ⁻²)
1	0	0	0	0	0	0
2	1500	22	20	4	5	440
3	1500	22	20	10	2	440
4	1500	22	20	20	1	440
5	2100	42	2	1	2	84
6	2100	42	5	2.5	2	210
7	2100	42	10	2	5	420
8	2100	42	10	5	2	420
9	2100	42	10	10	1	420
10	2100	42	15	7.5	2	630
11	2100	42	20	10	2	840
12	2100	42	25	12,5	2	1050
13	3000	87	5	1	5	435
14	3000	87	5	2,5	2	435
15	3000	87	5	5	1	435

First, modalities 1, 5, 6, 8, 10, 11 and 12 were selected to study the impact of an increasing fluency with the same flash frequency (2 Hz) and fluency per flash (42 mJ.cm⁻²). Then, modalities 2, 3, 4, 7, 8, 9, 13, 14 and 15 were selected in order to evaluate the impact of both the fluency per flash (22 mJ.cm⁻², 42 mJ.cm⁻² and 87 mJ.cm⁻²) and the flash frequency (1 Hz, 2 Hz and 5 Hz) at equivalent total fluencies. Total fluency for the different treatment modalities was calculated according to the number of applied flashes and the fluency per flash (mJ.cm⁻²).

II.2.3. Yeasts growth monitoring after PL treatments on YPD solid medium

After treatment, plates were incubated in the dark at 24°C, a temperature chosen to support the growth of all yeast species tested here. The growth was monitored every day during 10 days: plates were imaged from an illuminated desk to avoid light gleam (model DMC-FS7, Panasonic Corporation, Japan). Growth data was analysed with custom-made scripts in R (R Development Core Team, 2013). Briefly, plate images were imported on R using the *OpenImageR* package. The images of the plates were cropped for superimposition and the position of the drops was determined by manual clicking using the *grid* package and the *grid.locator* function. The area of each drop (in mm²) was calculated using automatic background subtraction.

II.2.4. PL treatment of yeasts inoculated in red wine

In this study, 18 L of Bordeaux red wine (Merlot and Cabernet Sauvignon blend of the 2019 vintage) were used for both yeasts adaptation and PL treatments. This wine was chosen for its high UV absorbance ($\alpha_{254nm} = 49 \text{ cm}^{-1}$) and its low free SO₂ content (< 15 mg.L⁻¹). In order to facilitate selected yeast strains adaptation and growth into the wine, few drops of hydrogen peroxide were added to the wine until free SO₂ content reached zero. Then, to ensure complete sterilization, wine was pasteurized (80°C for 40 minutes) and kept at 4°C. *B. bruxellensis* (L1735, L1737, L1746, AWRI1499, AWRI 1608, CBS2499), *S. cerevisiae* (FX10, L0437), *L. thermotolerance* (CLIB292) strains were selected for this liquid assay. Those strains were firstly grown on YPD plates, then inoculated in YPD liquid medium (24°C) and finally in sterile red grape juice. In order to lower the lethality due to the inoculation in the wine during PL treatments, this was done by gradually increasing the proportion of pasteurized wine in

the culture medium until it reached 90 %. Populations were counted using Malassez cell with addition of methylene blue. Finally, right before PL treatments, each strain was inoculated alone at a final concentration of 10^5 - 10^6 CFU.mL⁻¹ in three 500 mL batches of pasteurized red wine. Wine Treatments were realized in continuous flow at 9 L.h⁻¹ in a home-made reactor which consists in a 2 mm inner diameter FEP tubing (16,5 m length) coiled around PVC tubing (8 cm inner diameter, 25 cm length). The reactor was placed horizontally, 15 cm under the lamp in the PL treatment apparatus (LP.Box, Sanodev, France) (Figure 41). This type of reactor was chosen in order to limit the thickness of the liquid treated and to homogenize the residence time of the wine in the device.

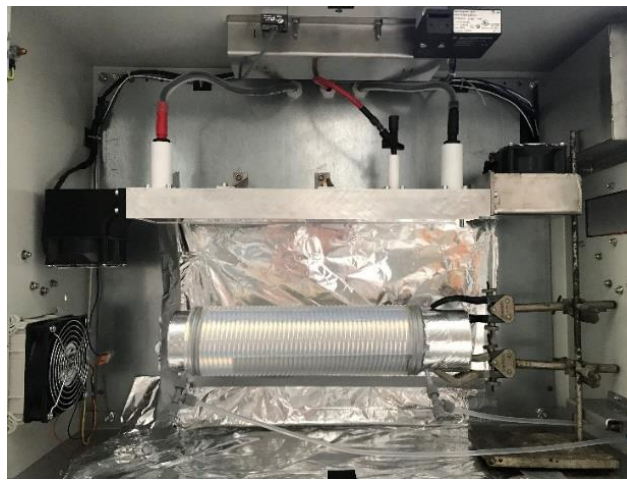


Figure 41 : Experimental setup for PL treatment of wine

In order to estimate the theoretical fluency applied to the wine during one pass in the reactor at 9 L.h⁻¹, the following calculation was made:

$$F_{Total} = n_{flash} * F_{flash}$$

$$n_{flash} = Freq * RTD$$

$$RT = \frac{Q}{V_{tube}}$$

$$V_{tube} = L_{tube} * 2 * \pi * R^2$$

F_{Total} : Total fluency (mJ.cm ⁻²) n_{flash} : Number of flashes received F_{flash} : Fluency per flash (mJ.cm ⁻²) $Freq$: Flash frequency (Hz) RTD : Residence Time (s) Q : Flow rate (m ³ .s ⁻¹) V_{tube} : Tube volume (m ³) L_{tube} : Tube length (m) R : Tube radius (m)
--

We considered that given the reactor's geometry, wine was exposed to PL only half of its residence time in the reactor. With this postulate the following approximation was made :

$$F_{Total} = \frac{n_{flash} * F_{flash}}{2}$$

Flash frequency was set on 4.5 Hz, the reactor was placed 15 cm under the lamp and the lamp tension was 4000 V, which corresponds to a fluency per flash of 169 mJ.cm⁻² at the surface of the reactor. The measured RTD was 20 seconds so the wine theoretically received up to 45 flashes resulting in a total fluency of 7,6 J.cm⁻² per pass in the reactor. Each 500 mL of inoculated wine batches was then treated with the following modalities: 0 J.cm⁻² (OFF: circulated in the reactor without PL treatment), 7.6 J.cm⁻² (T1: circulated once with PL), 15.2 J.cm⁻² (T2: circulated twice with PL) and finally 22.8 J.cm⁻² (T3: circulated thrice with PL). Samples (5 mL) were collected under sterile conditions right after inoculation (T0) and after each treatment (OFF, T1, T2 and T3).

II.2.5. Yeasts enumeration before and after red wine PL treatments

Microbial counts were determined in triplicates by plating serial 10-fold dilutions of the samples and 10 or 100 µL were plated in 9cm diameter petri dishes. Yeasts were enumerated on YPD plates after 7 days of incubation at 25 °C. The number of colonies detected was expressed in CFU.mL⁻¹ and the limit of detection was 10 CFU.mL⁻¹. The OFF modality was used as reference for log₁₀ reduction determination. Analyses of variance (ANOVA) were performed followed by post-hoc Tukey tests (*HSD.test* function from *agricolae* package, R software).

II.3. Results

II.3.1. Sensitivity to PL treatment: large screening on Petri dishes

In this first part, PL sensitivity was assessed for 198 yeast strains belonging to 14 different species (Tableau 11). These species are known to be associated with grape and/or wine. Between 2 and 3 strains per species were chosen to represent the genetic diversity of the species. In addition, we focused on two species, *B. bruxellensis* and *S. cerevisiae*, for their importance in winemaking, using different strains from various origins.

II.3.1.1. Monitoring the impact of pulsed light treatment on yeast growth

In order to estimate the impact of each parameter, different modalities were studied (Tableau 12) with variation of fluency per flash (F_{Flash} (mJ.cm⁻²) (22, 42 and 87 mJ.cm⁻²)), total fluency (F_{Total} (mJ.cm⁻²)) and frequencies (Freq (Hz) (1, 2 and 5 Hz)), resulting in 15 combinations, in

order to estimate the impact of each parameter. The growth was monitored daily, up to 10 days. For each strain (198 strains), each initial density (4 densities) and each modality, the growth area was measured automatically using home-made R scripts. Triplicates were performed so that more than >350,000 datapoints were included in the dataset.

First, the total fluency impact was accessed (Figure 42). Modalities 1, 5, 6, 8, 10, 11 and 12 were applied at 2Hz with a fluency per flash of 42 mJ.cm⁻² and only differed by the number of flashes applied (respectively 0, 2, 5, 10, 15, 20 or 25) corresponding to different total fluencies (respectively 0, 84, 210, 420, 630, 840 and 1050 mJ.cm⁻²). Figure 42 shows three distinct behaviors in view of total fluency increased, and the general attitude of all the strains used.

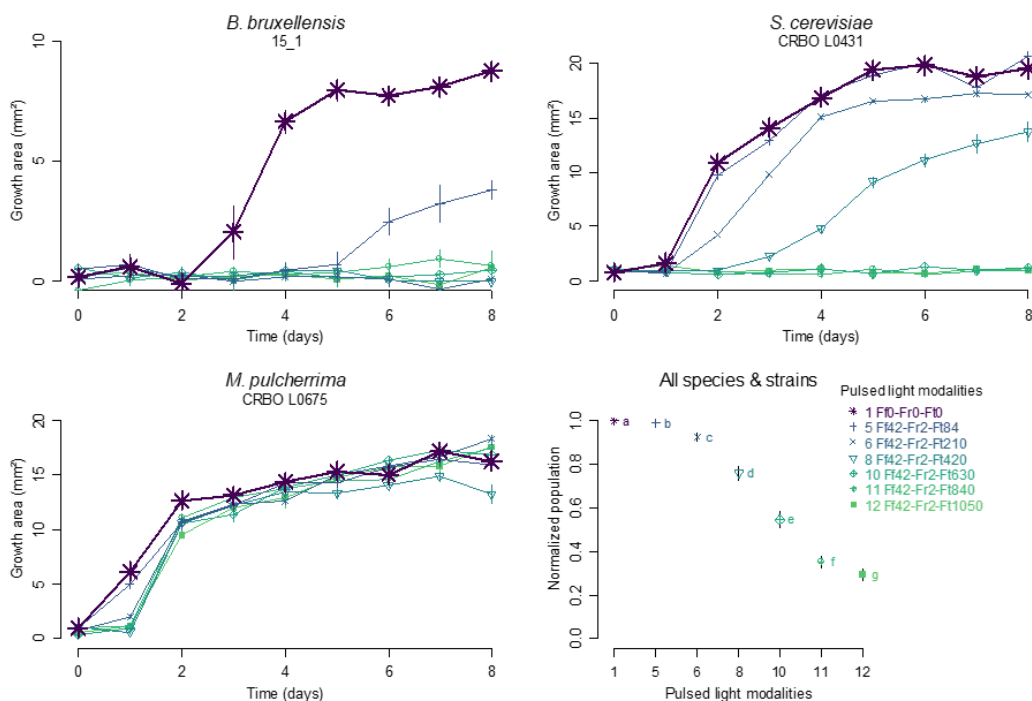


Figure 42 : Growth kinetics of three yeast strains depending on the total fluency applied on the pulsed light treatment (0, 84, 210, 420, 630, 840 and 1050 mJ.cm⁻²).

Seven modalities were used (1, 5, 6, 8, 10, 11 and 12). Ff stand for fluency per flash (mJ.cm⁻²), Fr for frequency (Hz) and Ft for total fluency (mJ.cm⁻²). The density of 100 cells/drop was used for comparison. Growth area was measured in mm². Normalized population correspond to the area under the curve measured for all strains (198). The letters correspond to significant differences between each modality (Kruskal-Wallis).

B. bruxellensis strains expressed a highly sensitive behavior to PL. For example, for strain 15_1 (Figure 42), 84 mJ.cm⁻² (modality 5: 2 flashes at 42 mJ.cm⁻², 2 Hz) were sufficient to halve its growth and all other treatments were sufficient to prevent its growth. For strain *S. cerevisiae* CRBO L0431, treatment with 84 mJ.cm⁻² did not impact this strain growth, treatments with 210 and 420 mJ.cm⁻² (modalities 6 and 8) reduced yeast growth by 20 % and 35 % respectively, and finally only total fluencies higher than 630 mJ.cm⁻² (modalities 10, 11 and 12) fully

prevented CRBO L0431 growth. *M. pulcherrima* CRBO L0675 strain appeared poorly affected, none of the applied treatments was sufficient to reduce clearly the final cell growth. However, treatments with 210 mJ.cm⁻² and higher total fluencies induced a lagging phase (24 hours). Considering all the strains, every modality was significantly different from each other, indicating that the higher the fluency, the greater the reduction in growth. The total fluency has a microbiological effect on the yeast growth.

Secondly, modalities 1, 3, 8 and 14 were compared (Figure 43), to study the fluency per flash impact. Four fluencies per flash were applied (0, 22, 42 and 87 mJ.cm⁻²) with proximate total fluencies (430 mJ.cm⁻²) and frequency (2 Hz).

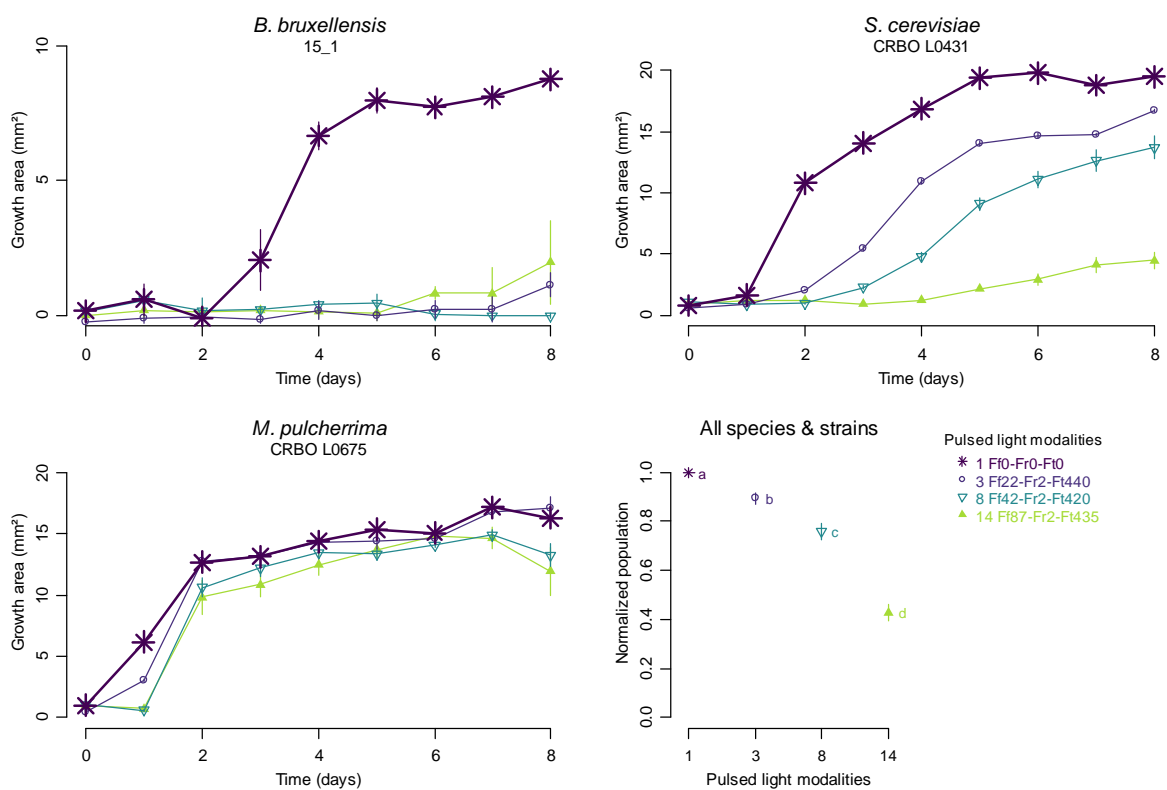


Figure 43 : Growth kinetics of three yeast strains depending on four different fluency per flash applied on the pulsed light treatment (0, 22, 42 and 87 mJ.cm⁻²).

Four modalities were used (1, 3, 8 and 14). Ff stand for fluency per flash (mJ.cm⁻²), Fr for frequency (Hz) and Ft for total fluency (mJ.cm⁻²). The density of 100 cells/drop was used for comparison. Growth area was measured in mm². Normalized population correspond to the area under the curve measured for all strains (198). The letters correspond to significant differences between each modality (Kruskal-Wallis).

The impact of fluency per flash varies considering the yeast regarded (Figure 43). For example, *B. bruxellensis* strain 15_1 was highly sensitive for the three fluencies per flash apply. By contrast, *M. pulcherrima* strain CRBO L0675 appears poorly sensitive to all fluencies per flash treatments tested here, only a growth delay was observed (around 24 hours). *S. cerevisiae* CRBO L0431 showed an intermediary profile with a wide variation of respond. The greater the

fluency per flash, the greater the growth was impacted: 80 %, 60 % and 25 % of the maximal growth corresponding to 22, 42 and 87 mJ.cm² respectively. The lag phase was also impacted. In general, all the species were more impacted if the fluency per flash was high. The fluency per flash of 22 mJ.cm² corresponding to 90% of the maximal growth, 42 mJ.cm² to 75 % and the 87 mJ.cm² to 40 %. At same total fluency, the impact of fluency per flash has an important impact on yeast growth.

Modalities 2, 3 and 4; 7, 8 and 9; 13, 14 and 15 were then used to study the impact of the frequency of flashes (1, 2 and 5 Hz) on yeast growth (Figure 44). Within the three modality groups, the fluency per flash and the total fluency apply were uniform.

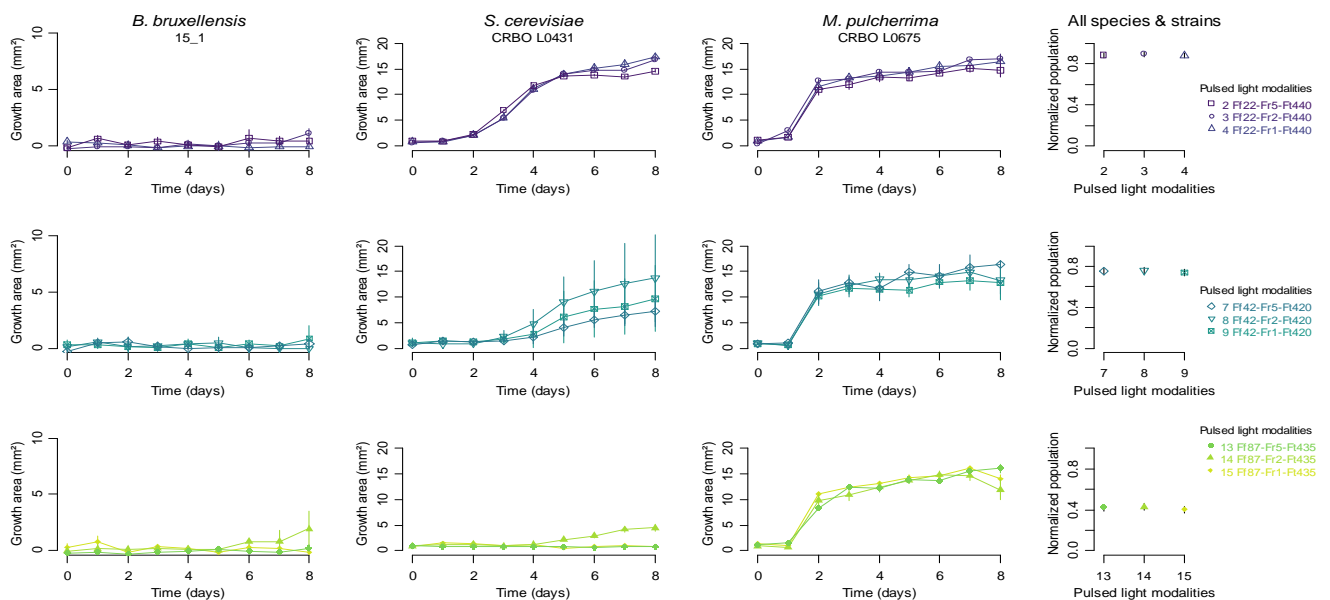


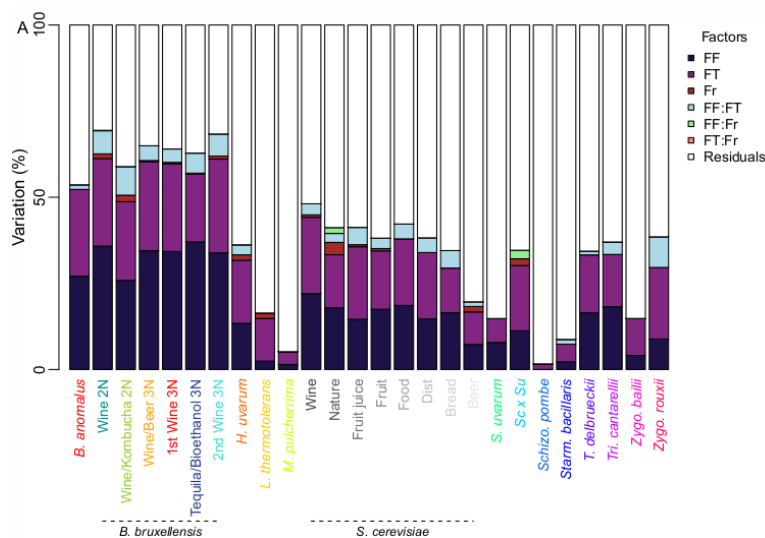
Figure 44 : Growth kinetics of three yeast strains depending on the frequency applied on the pulsed light treatment (1, 2 and 5 Hz)

Nine modalities were used (2, 3, 4, 7, 8, 9, 13, 14 and 15). Ff stand for fluency per flash (mJ.cm⁻²), Fr for frequency (Hz) and Ft for total fluency (mJ.cm⁻²). The density of 100 cells/drop was used for comparison. Growth area was measured in mm². Normalized population correspond to the area under the curve measured for all strains (198).

The growth of the three strains were not different within the three modalities' groups. The three yeasts strains were not sensitive to the different frequency used whatever the total fluency or the fluency per flash. No significant differences were observed for the three groups of modalities for all strains (198). The frequency did not affect the efficiency of the PL treatment in the tested conditions at same fluency per flash and total fluency.

II.3.1.2. Impact of PL treatment parameters

In order to identify the most important factors (fluency per flash, total fluency, frequency as well as their potential interactions) affecting the maximal population size, an ANOVA was performed for each strain. The percent of variation explained by each factor is represented on the barplot and resume by species or subpopulations (Figure 45 A). The fluency per flash was the most impacting factor, explaining around 17% of the total variation of population size for all species, with important variation depending on the strain/species (range of 0 to 37%). The total fluency also had a strong implication and variation regarding on the strain/species, with 16.8 % of the total variation (range of 1.6 % to 27 %). In accordance with the result above (Figure 44), the frequency impact was small (0.6 %, range of 0 to 3 %). However, interaction between fluency per flash and total fluency was low (3.2 % range of 0 to 8%). The interaction between both factors can be seen on the isocurve response (Figure 45 B): below 22 mJ.cm⁻², globally no or poor effect of pulsed light treatment on yeast growth was achieved, no matter the total fluency. Indeed, the total fluency is an important factor, but only when the fluency per flash is already sufficient to impact yeast growth.



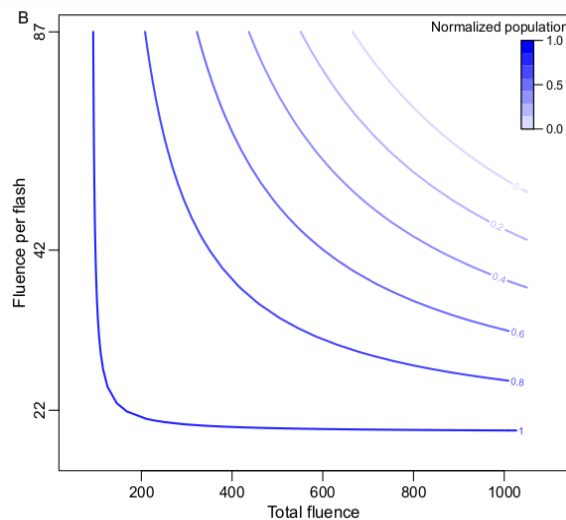


Figure 45 : Factors impacting pulsed light treatment efficiency.

A- Percentage of variation explained by the different factors (fluency per flash, total fluency and frequency) and their interactions for all tested species and strains aggregate by species or subgroups.

B- B- Isocurve representation of the normalized population size depending on the two main factors, fluency per flash and total fluency.

Altogether, these analyses showed that the fluency per flash is the most important factor that conditioned the efficiency of pulsed light treatment. Total fluency is the other factor that affects PL efficiency on yeast growth, but requires a minimal impact of the fluency per flash to be efficient.

These analyses also showed that the impact of these factors varied greatly depending on the species and strain. Both *Brettanomyces* species (*B. anomalus*, 3 strains and *B. bruxellensis*, 111 strains) were significantly impacted by fluency per flash and total fluency, while the three tested strains of *Mechnikovia pulcherrima* or *Starmerella bacillaris* appeared poorly or not impacted. *S. cerevisiae* and many non-*Saccharomyces* species displayed an intermediary behavior.

II.3.1.3. Interspecific and intraspecific variability according to PL sensitivity

In order to analyze the impact of pulsed light treatment depending on the species, a K-means clustering analysis was performed. The maximal population (area in mm²) was compared to the none treated one (modality 0) for normalization in order to measure the treatment impact on growth. Four groups of strains were identified (Figure 46), group 1 encompassing very sensitive strains (i.e., sensitive at low fluency per flash/low total fluency), group 2 and 3 containing strains sensitive to increasing fluency per flash and/or total fluency, and group 4 being sensitive only to the most efficient modalities. Interestingly, a strong variation

depending on the species was observed: all tested strains of *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *Starm. bacillaris*, *Zygo bailii*, *T. delbrueckii* clustered in the less sensitive group (G4). Conversely, strains of *B. anomalus* and *B. bruxellensis* were exclusively distributed in the more sensitive groups (G1-G3).

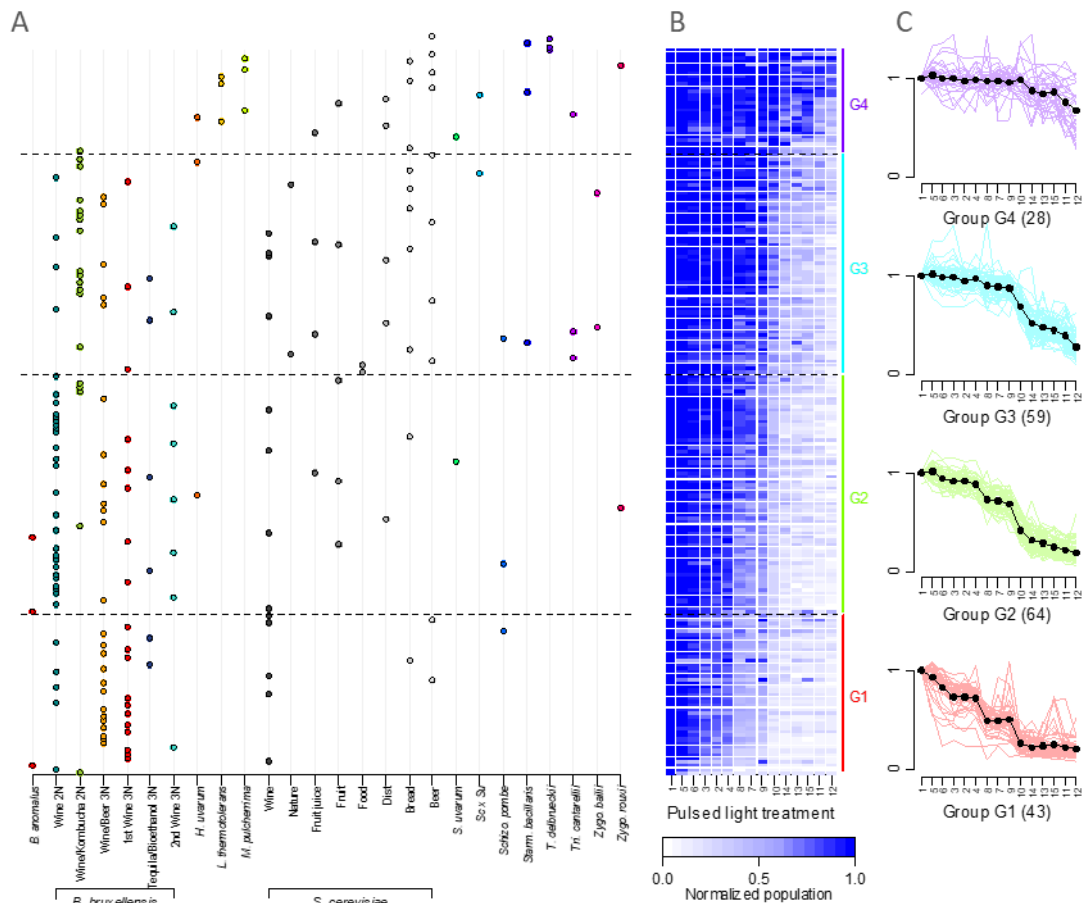


Figure 46 : Clustering of 198 yeast strains depending on their sensitivity to pulsed light treatment.

K-means clustering identified an optimum of 4 groups (G1-G4), G1 containing the more sensitive strains and G4 the less sensitive ones. *Sc x Su* stands for *S. cerevisiae* x *S. uvarum*.

A - Distribution of the strains in the different sensitivity groups per species and/or substrates.

B - Heatplot showing the normalized population size (one line per strain) depending on the 15 modalities of pulsed light treatment. Modalities were ordered from the less to the most impacting on yeast growth: 1, 5, 6, 3, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 14, 13, 15, 11 and 12.

C - Bidimensional plot showing the normalized population depending on the 15 modalities of pulsed light treatment for each group.

A focus was made on *S. cerevisiae* and *B. bruxellensis* strains to explore the intra-diversity PL response. To compare the different strains, the maximal growth means of all treatment applied was used as proxy and presented in Figure 47.

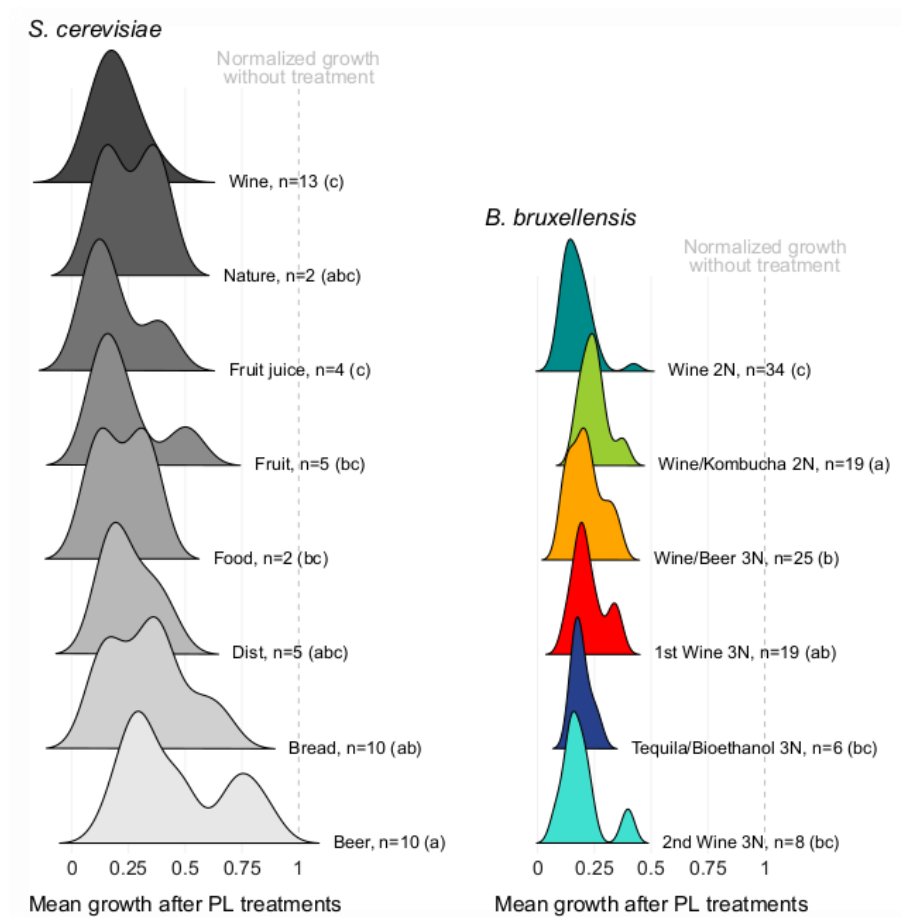


Figure 47 : Influence of pulsed light treatments on the growth of *S. cerevisiae* and *B. bruxellensis* subgroups.

AUC correspond to Area Under the Curve and represent the growth for the 15 modalities. For each subgroup, a Kruskal-Wallis test was performed on AUC to identify significant differences between groups. Different letters (in brackets) denote different significance groups

For *S. cerevisiae*, strains associated with brewery, bakery and distillery processes were significantly less sensitive to PL treatments compared to wine and fruit juice strains. Wild isolates and strains associated with food spoilage (Nature, Food, Fruit, Fruit juice groups) showed intermediary behavior. By contrast, all six subpopulations of *B. bruxellensis* showed lower maximal growth than *S. cerevisiae*, indicating that *B. bruxellensis* was more sensitive to PL treatments. In *B. bruxellensis* also, PL impact varied depending on the genetic group, with Wine/Kombucha 2N group less sensitive to PL treatment. Wine 2N, Tequila/Bioethanol and 2nd Wine 3N were the more sensitive. Wine/Beer 3N and 1st Wine 3N have an intermediate behavior. Altogether, these results showed that the sensitivity to PL treatments varied depending on the yeast species, but also depending on the origin of the strains.

II.3.2. Sensitivity to PL treatment of various yeasts species and strains in red wine

In a second part of this study, the PL potential was evaluated for the microbial stabilization of various inoculated yeasts species and strains in red wine (Figure 41). We selected six strains from *B. bruxellensis* belonging to the three main wine-related genetic groups (Avramova et al 2018) already used in another related study (Pilard et al 2021). To compare the relative sensitivity of this species, two *S. cerevisiae* and one *L. thermotolerans* strains were also selected. Thus, nine yeast strains were submitted to four different PL treatments (Figure 48). The \log_{10} reduction from the T0 population was used for the different statistical analyses, in order to take into account variations in initial populations. An ANOVA analysis was made to decipher the part of the PL and the groups (used in Figure 48). The PL treatments explained 81 % of the variation, 7 % were explained by the groups.

Concerning the impact of each modality, no significant differences in viability were observed between the T0 and OFF modalities, evidencing that pumping through the apparatus had no impact on cell viability. The 3 PL modalities, T1 (7.6 J.cm⁻²), T2 (15.2 J.cm⁻²), T3 (22.8 J.cm⁻²) were significantly different from T0 and OFF modalities and from each other, with the higher the fluency, the higher the logarithmic reduction.

Regarding the sensitivity to PL for the three species, *B. bruxellensis* strains were all highly sensitive compared to other species, resulting approximately in 1 \log_{10} CFU.mL⁻¹ reduction with T1 treatment, 3 to 5 \log_{10} CFU.mL⁻¹ reduction for T2 treatment, and finally more than 6 \log_{10} CFU.mL⁻¹ reduction (below our detection threshold for each strain) with T3 treatment (Figure 48). *S. cerevisiae* strains expressed the lowest sensitivity, with 0.5, 1 and 2 \log_{10} CFU.mL⁻¹ reduction respectively for treatments T1, T2 and T3. The *L. thermotolerans* strain showed an intermediate response to PL compared to other species, with 0.5, 2 and 5 \log_{10} CFU.mL⁻¹ reduction respectively for treatments T1, T2 and T3.

Considering the variation within *B. bruxellensis* genetic groups, the Wine 2N and the 1st Wine 3N strains were significantly more sensitive than the Wine/Beer 3N strains. *L. thermotolerans* CLIB292 expressed an intermediary sensitivity, between *B. bruxellensis* and *S. cerevisiae* strains. The two *S. cerevisiae* strains did not express significant levels of growth reduction.

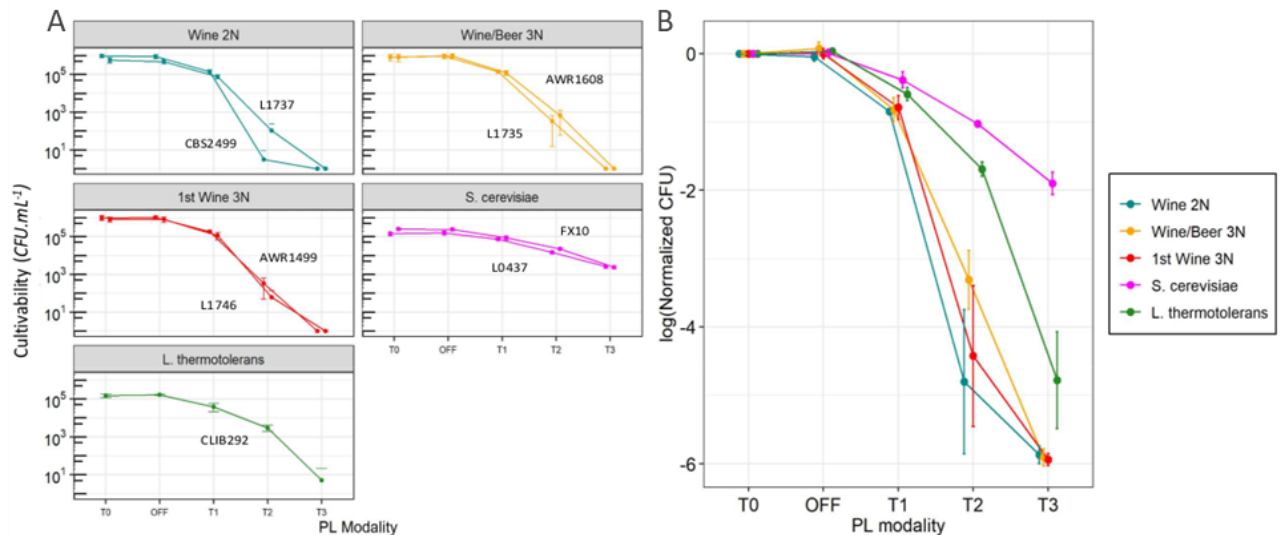


Figure 48 : Cultivability of 9 strains under 4 increased PL treatment. (A) Cultivability is expressed in CFU.mL⁻¹.

Normalized survival curves are groups by genetic groups or by species, normalized to the mean of the concentration at T0. The mean of triplicates +/- standard errors were represented for each modality.

II.4. Discussion

The present study aimed to explore the yeast sensitivity related to winemaking and vineyard. On the first hand, a large yeast collection related to wine were used, encompassing 14 species and 198 strains, for a rapid plate screening method on 15 PL modalities. On the other hand, a continuous flow-through approach was conducted on nine strains from 3 species, in order to evaluate the necessary dose for microbial inactivation and validated the species variability observed on plate screening.

II.4.1. The total fluency and fluency per flash governing the PL efficiency on solid media

First, the impact of three different treatment parameters governing the efficiency of PL treatment (*e.g.*, fluency per flash, total fluency and frequency) were investigated. Among these three PL parameters, fluency per flash and total fluency impacted strongly the growth reduction (17 % and 16.8 % respectively). An increasing dose for both parameters was correlated with a higher growth reduction. Although, the two parameters were dependent and interlinked for the efficiency of the treatment. Similar total fluencies did not induce the same germicidal effect depending on the way the energy was distributed. Indeed, a minimal fluency per flash was required (22 $\mu\text{J}.\text{cm}^{-2}$) to impact cells growth, indicating a probable peak

effect observed for fluency per flash values equal or greater (Figure 45 B) (Gómez-López et al. 2007a). The existence of this fluency threshold is in contradiction with Bunsen-Roscoe law, which enounce that only the total fluency governs the PL efficiency (Kramer, Wunderlich, et Muranyi 2017a). This result has already been observed on bacteria surface treatment (Kramer, Wunderlich, et Muranyi 2017c; Luksiene et al. 2007), as well as in continuous flow-through (*Listeria innocua*) (Artíguez, Lasagabaster, et Marañón 2011). Here, the frequency modulation (between 1 and 5 Hz) was almost without effect (0.06 %) on PL treatment efficiency. This indicates that for PL applications, the flash frequency can be increased (or reduced) maintaining the same total fluency without affecting the process efficiency, which can be interesting to reduce the time treatment needed at industrial scales.

II.4.2. Cellar resident yeasts expressed higher sensitivity to PL than vineyard yeasts

Concerning the sensitivity between the different yeast species, a great variability was observed (Figure 46). *Brettanomyces* species were highly sensitive to PL, in contrary to *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *Starm. bacillaris*, *Zygo. bailii*, *T. delbrueckii* which were sparsely impacted. A last group of intermediary behaviours was composed *H. uvarum*, *Saccharomyces* species, *Schizo. pombe*, *Tri. cantarelli*, *Zygo. rouxii*. Several hypotheses can be made to explain such variability among the different species. This ranking is globally in accordance with a previous plate screening study led on continuous UV-C treatment, where *Brettanomyces* species were highly impacted when other species such as *M. pulcherrima* or *Starm. bacillaris* were less affected (Pilard et al. 2021). These results argue toward the overriding role of the UV-C into PL efficiency. Secondary metabolites (photoprotective pigments, mycosporine-like amino acids) (Gao et Garcia-Pichel 2011 ; Singaravelan et al. 2008; Bisquert, Muñiz-Calvo, et Guillamón 2018), DNA repair mechanisms (photoreactivation and dark repairs mechanisms) (M. Zhang, Wang, et Zhong 2017; Friedberg et al. 2005), wall thickness and composition (Beauchamp et Lacroix 2012) and possibly clustering ability (shielding effect) are implied to protect microorganisms from light damages, and their amount or efficiency may vary from a specie to another. Although, the less sensitive group encompass species, which are mainly associated to the vineyard on grape berries, therefore frequently exposed to sun light (Cristian Varela et Borneman 2017; Zott et al. 2008; Sipiczki 2016). On the opposite, *B. bruxellensis* or *B. anomalus* are barely isolated from grape berries but mainly from

anthropized environments (cellar, equipment, barrels), thus rarely exposed to UV radiations (Loureiro et Malfeito-Ferreira 2003b; C. Wang et al. 2015). UV radiations were already shown to influence and modulate yeast community at ecological scale (Libkind et al. 2009; Longan et al. 2017). *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* and *M. pulcherrima*, which were few affected by PL treatments, can be used by the winemaker as technological auxiliaries for acidification, biocontrol agent or improve aromas in the grape must (Roudil et al. 2019; Windholtz et al. 2021). PL treatment may be used to eliminate the unwanted yeasts and promote the establishment of such auxiliaries from the vineyard after the harvest.

Regarding the results on red wine PL treatment, the sensitivity of *B. bruxellensis* strains were also highly marked, with 6 log₁₀ CFU.mL⁻¹ reduction (below the detection limit) compared to *S. cerevisiae* strains (2 log₁₀ CFU.mL⁻¹ reduction) for a total fluency of 22.8 J.cm⁻² (Figure 48). This was in accordance with the plate screening results. Surprisingly, the *L. thermotolerans* strain, which was among the less sensitive in plate screening, was more impacted than *S. cerevisiae* in the wine. This may be explained by the physiology state of this species in red dry wine. Therefore, the adaptation of this species to wine was long and tedious compared to the others (data not show). In any case, the viability reduction of *B. bruxellensis* was strong, which underlines the interest of using PL against this yeast spoilage.

II.4.3. Intraspecific sensitivity within *B. bruxellensis* and *S. cerevisiae*

A focus on *B. bruxellensis* (111 strains) and *S. cerevisiae* (49 strains) yeast species on plates as well as in liquid was made for their relevance in beverages (Tubia et al. 2018b; Hirst et Richter 2016). Although *S. cerevisiae* species was less sensitive than *B. bruxellensis*, important variability were observed between strains in both species (Figure 47). Within *B. bruxellensis* genetic subpopulations recently unveiled (Eberlein et al. 2021), the Wine 2N isolates were more affected than 1st Wine 3N and Wine/Beer 3N isolates on plate screening. This trend was also observed on liquid treatment, however, with a subset of strains. Surprisingly, the Wine 2N group was found to be much affected by PL than the 1st Wine 3N and Wine/Beer 3N groups, while this group expressed lower sensitivity to continuous UV-C treatments (Pilard et al. 2021). This might be attributable to the additional effects of photothermal and photophysical mechanisms due to PL high intensity and large emission spectrum. Regarding *S. cerevisiae*, diverse behaviours were observed within the subpopulations described, but the Wine and

Fruit juice isolates showed an increased sensitivity compared to isolates from Beer and Bread environments. The highest sensitivity of Wine isolates might be explained by the isolation niche, where the UV radiation is rare. Although being responsible of the necessary fermentation of sugar into ethanol, *S. cerevisiae* can act as spoiler causing an unwanted 'refermentation' of sweet wine due to its ethanol and SO₂ resistance (Malfeito-Ferreira 2019; Divol, Miot-Sertier, et Lonvaud-Funel 2006). Hence, PL utilization for *S. cerevisiae* managing in winemaking might be a promising track.

II.5. Conclusion

This study brings information about the efficiency of three parameters of PL on yeast sensitivity (fluency per flash, total fluency and frequency) as well as the sensitivity of yeasts related to the winemaking environment using plate-screening approach. On one hand, it was demonstrated that total fluency and fluency per flash affect the PL efficiency. Indeed, this study shows (and confirms results from other previous studies) that the fluency per flash has to be set at or above a threshold value so that the treatment can be efficient. Once this threshold value is reached, higher fluencies per flash and higher total fluencies improve the treatment efficiency. Regarding the frequency impact, it does not modify the treatment efficiency, which can be considered as a good thing regarding the possible reduction in processing times as well as the fact that this will facilitate the development of optimized reactors allowing the continuous processing of liquids. On the other hand, a strong phenotypic diversity regarding the PL sensitivity was observed at inter specific level. Interestingly, spoilage yeasts expressed higher sensitivity to PL treatments than "beneficial" yeasts. These results were confirmed in red wine continuous flow through treatments, *B. bruxellensis* strains were highly sensitive (6 log₁₀ CFU.mL⁻¹ reduction (below the detection limit) for a total fluency of 22.8 J.cm⁻²). However, considering PL application for winemaking, the impact of the treatment on wine's organoleptic properties has to be evaluated, which has not been done in this study and needs to be the goal of further work. The right combination of fluency per flash and total fluency has to be found in order to efficiently stabilize wine with the minimal impact of the process on wine's properties. Chemical and sensorial analyses of PL treated wines will have to be carried out in order to answer this problematic.

III. Conclusion générale

Cette étude apporte des informations sur l'efficacité de trois paramètres de la lumière pulsée sur la sensibilité des levures (fluence par flash, fluence totale et fréquence) ainsi que sur la sensibilité à la LP de 14 espèces de levures liées à l'environnement vitivinicole.

Premièrement, des résultats ont été obtenus concernant l'importance des différents paramètres opérationnels étudiés : la fluence par flash, la fluence totale ainsi que la fréquence de traitement. Parmi ces trois paramètres, la fluence par flash et la fluence totale étaient corrélées à une réduction de croissance plus élevée. Ces deux paramètres expliquent à eux seuls 33.8 % des variations du jeu de données (17 % et 16.8 % respectivement). Les résultats ont démontré une importance de la façon dont le rayonnement est distribué. En effet, pour des valeurs de fluence par flash inférieures à $22 \mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ les traitements n'ont eu globalement aucun effet sur la croissance des levures et ce quelle que soit la fluence totale appliquée. Pour des fluences par flash supérieures ou égales à $22 \mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ l'augmentation du nombre de flashes et donc de la fluence totale induit un ralentissement de plus en plus marqué des cinétiques de croissance. La corrélation entre la fluence totale et le ralentissement de croissance est donc valable uniquement lorsque l'intensité de chaque flash est supérieure ou égale à une valeur seuil, $22 \mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ dans notre cas. Ce résultat est en contradiction avec la loi de Bunsen-Roscoe qui énonce que seule la fluence totale régit l'efficacité germicide du traitement par LP, cependant, des observations similaires ont été décrites dans des études antérieures (Takeshita et al. 2003 ; Kramer et al., 2017).

Dans cette étude, la modulation de la fréquence de traitement (entre 1 et 5 Hz) n'a pas démontré d'effet sur l'efficacité du traitement. Cela implique que la fréquence de flash peut être augmentée (ou réduite) en maintenant la même fluence totale sans affecter l'efficacité du procédé. Ce résultat est très intéressant, car lors de traitement, il permet de réduire le temps de traitement nécessaire. De plus, dans le cas de traitement de liquide en continu, la fréquence peut donc être adaptée au débit de circulation sans affecter l'efficacité du procédé.

Concernant l'étude de la variabilité intra et interspécifique des niveaux de sensibilité à la LP, de grandes différences ont été observées entre les souches et espèces étudiées. Les espèces de *Brettanomyces* ont exprimé une sensibilité élevée à la LP, contrairement aux espèces *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *Starm. bacillaris*, *Zygo. Bailii* et *T. delbrueckii* qui n'ont été

que peu impactées par l'ensemble des traitements. Enfin, les espèces de *Saccharomyces* ainsi que *H. uvarum*, *Schizo. pombe*, *Tri. Cantarelli* et *Zygo. Rouxii* constituaient un groupe présentant un niveau de sensibilité intermédiaire. Ce classement des niveaux de sensibilité correspond globalement aux observations faites lors de travaux précédents sur l'étude des niveaux de sensibilité au rayonnement UV-C de 147 souches de levures. Ce résultat plaide en faveur du rôle primordial de l'effet photochimique lié au rayonnement UV dans l'efficacité germicide de la LP. De même, le groupe le moins sensible comprend des espèces qui sont principalement identifiées au vignoble et donc fréquemment exposées à la lumière du soleil. À l'inverse, *B. bruxellensis* ou *B. anomalus* sont principalement rencontrées au cours de la vinification donc plus rarement exposées au rayonnement UV.

Dans cette partie, l'accent a également été mis sur les espèces de levures *B. bruxellensis* (111 souches) et *S. cerevisiae* (49 souches). Au sein des sous-populations génétiques de *B. bruxellensis*, les isolats Wine 2N étaient plus affectés que les isolats 1st Wine 3N et Wine/Beer 3N lors du criblage sur milieu solide. Cette tendance a également été observée lors des traitements dans le vin sur un sous-ensemble de souches. Étonnamment, le groupe Wine 2N s'est avéré beaucoup plus affecté par la LP que les groupes 1st Wine 3N et Wine/Beer 3N, alors que ce groupe exprime une sensibilité plus faible aux traitements UV-C continus. Cette sensibilité accrue à la LP par rapport aux UV-C pourrait être attribuable aux effets additionnels des mécanismes photothermiques et photophysiques dus à la haute intensité et au large spectre d'émission de la PL. Concernant les souches de *S. cerevisiae*, divers comportements ont été observés au sein des sous-populations étudiées, d'une manière générale les souches isolées de vins et de jus de fruits ont montré des niveaux de sensibilité accrus par rapport aux souches des autres sous-populations (bière et pain).

D'une manière générale, les levures d'altération ont exprimé une sensibilité plus élevée aux traitements par LP que les levures « bénéfiques ». Ces résultats ont été confirmés dans les traitements en flux continu du vin rouge, au cours desquels le traitement le plus intense (fluence totale estimée de 22.8 J.cm⁻²) a permis une réduction de 6 log seulement pour les souches de *B. bruxellensis*. Concernant le traitement de vin, l'impact du procédé sur la qualité des produits traités n'a pas été évalué dans cette partie. La caractérisation de l'impact organoleptique devra faire l'objet de futurs travaux, en effet, cet aspect est indispensable afin de favoriser l'émergence de ce nouveau procédé. Dans cette partie, l'impact des paramètres

opérationnel a été étudié sur l'efficacité du traitement, de la même façon, l'impact de ces mêmes paramètres sur le vin devra également être évalué afin de trouver l'équilibre optimal entre efficacité germicide et conservation des qualités organoleptiques.

CHAPITRE V : Caractérisation de l'impact du procédé UV-C sur les propriétés physico-chimiques de 10 vins de cépages variés.

I. Introduction

Différents travaux ont permis d'évaluer les doses permettant d'assurer la stabilisation microbiologique de moûts et vins variés. Les résultats de ces travaux font état de doses allant de plusieurs centaines de joules par litre pour le traitement de vin faiblement absorbants (600 à 1200 J.L⁻¹) à des doses allant jusqu'à plusieurs milliers de joules par litre pour la stabilisation des vins les plus absorbants (3000 à 6000 J.L⁻¹) (Junqua et al., 2020 ; Golombek et al., 2021 ; Dlesler et al., 2019). Ces mêmes études ont parfois apporté des éléments de réponse vis-à-vis de l'impact de ces doses UV-C sur les qualités organoleptiques de vins traités. Les résultats obtenus ont le plus souvent permis de conclure à une absence d'impact ou bien à des modifications non perceptibles à la dégustation. Les travaux démontrant un impact du rayonnement UV-C sur les propriétés organoleptiques des vins ont montré que l'apparition d'éventuels défauts ou pertes aromatiques n'arrivait qu'avec l'emploi de doses UV-C beaucoup plus importantes (>10 kJ.L⁻¹) par rapport à celles recommandées pour la stabilisation microbiologique.

Cette partie a pour but de d'améliorer les connaissances concernant l'impact du procédé UV-C sur des vins variés dont la composition spécifique induirait une sensibilité particulière au rayonnement. En effet, en raison de la complexité chimique du vin, un grand nombre de composés sont susceptibles d'interagir directement avec le rayonnement ou bien indirectement par réaction avec des composés photosensibilisateurs. La diversité chimique des vins résulte du choix de cépage, des conditions du millésime ainsi que des pratiques culturales et œnologiques.

Dans cette partie, afin, des lots de 50 l de 10 vins différents ont été traités avec des intensités correspondants aux doses requises pour leur stabilisation microbiologique en fonction de leurs profils respectifs. Ainsi, 3 vins blancs (Sauvignon blanc, Chardonnay et Gewurztraminer) ainsi qu'un rosé de Provence ont été traités avec une dose de 1200 J.L⁻¹ et 6 vins rouges (Merlot, Cabernet sauvignon, Syrah, Pinot noir, Grenache et Malbec) avec une dose de 6400 J.L⁻¹. Une fois le traitement réalisé, les vins ont été mis en bouteilles et conservés 6 mois avant d'être analysés chimiquement et sensoriellement. Afin de différencier l'impact lié au rayonnement et celui lié à la manipulation (pompage, mise en bouteille, conservation), les vins traités par rayonnement UV-C (modalité UV) ont été comparés aux mêmes vins ayant circulé de manière identique dans l'appareil mais sans être exposés au rayonnement (modalité CT).

Les caractéristiques du pilote utilisé, les protocoles de traitements UV-C ainsi que les protocoles analytiques sont présentés dans le chapitre précédent (Chapitre II, parties I.2 et II). Pour plus de clarté, nous avons décidé de présenter tout d’abord les résultats concernant les vins rouges puis les vins blancs / rosés.

II. Résultats

II.1. Vins rouges

Les résultats présentés dans cette partie concernent la caractérisation de l’impact d’un traitement UV-C à 6600 J.L⁻¹ sur 6 vins rouges issus de cépages variés (M : Merlot, CS : Cabernet sauvignon, PN : Pinot noir, MB : Malbec, SYR : Syrah, GR : Grenache). Cette dose UV-C a été retenue car adaptée à la stabilisation microbiologique de ce type de vin fortement absorbant. Les paramètres standards, la couleur, la composition phénolique moléculaire et les teneurs en certains composés volatils ont été comparée entre une modalité traitée aux UV-C (6600 J.L⁻¹) et une modalité contrôle qui correspond au vin circulé dans l’appareil sans rayonnement. Ces analyses ont été réalisées après 6 mois de conservation des vins en bouteilles.

II.1.1. Paramètres standards et couleurs

Les analyses des différents paramètres standards n’ont pas révélé de différence entre les vins contrôles et les vins traités aux UV-C (Tableau 13).

Tableau 13 : Paramètres standards 6 mois après traitement : Merlot, Cabernet sauvignon, Syrah, Pinot noir, Malbec et Grenache avec et sans traitement aux UV-C.

	Merlot		Cabernet Sauvignon		Syrah		Pinot Noir		Malbec		Grenache	
	CT	UV	CT	UV	CT	UV	CT	UV	CT	UV	CT	UV
AT	3.07	2.86	2.24	2.37	2.46	2.62	3.71	3.76	3.08	3.24	2.49	2.51
AV	0.27	0.27	0.40	0.40	0.45	0.44	0.36	0.35	0.39	0.43	0.41	0.39
TAV	14.39	14.36	13.17	13.32	14.22	14.13	13.21	13.03	13.83	13.84	13.52	13.46
pH	3.65	3.77	3.93	3.88	3.99	4.00	3.45	3.46	3.40	3.37	3.54	3.53
SO₂ Libre	3.00	3.00	2.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	13.00	13.00	15.00	11.00
SO₂ Total	8.00	7.00	7.00	7.00	12.00	11.00	7.00	8.00	58.00	60.00	36.00	27.00

Les résultats concernant l'analyse colorimétrique des vins sont présentés ci-dessous (Tableau 14).

Tableau 14 Absorbances à 420, 520 et 620 nm et paramètres colorimétriques (CIELab) des vins de Cabernet sauvignon, Merlot, Syrah, Pinot noir, Grenache et Malbec après 6 mois de conservation.

	Cabernet Sauvignon		Merlot		Malbec		Syrah		Pinot Noir		Grenache	
	CT	UV	CT	UV	CT	UV	CT	UV	CT	UV	CT	UV
DO420	0.51	0.53	0.46	0.46	0.53	0.50	0.38	0.40	0.25	0.25	0.24	0.25
DO520	0.78	0.81	0.60	0.60	0.79	0.71	0.51	0.52	0.38	0.38	0.29	0.29
DO620	0.21	0.22	0.16	0.16	0.19	0.17	0.15	0.16	0.08	0.08	0.08	0.08
L*	38.50	37.40	46.70	47.20	40.00	43.70	51.10	49.60	63.30	63.50	68.10	67.90
a*	50.85	51.30	43.55	43.95	52.03	49.62	41.59	41.12	38.86	37.85	28.84	28.67
b*	8.26	9.34	12.72	13.82	16.52	17.75	6.23	7.04	5.21	7.11	6.95	7.16
ΔE		1.61		1.27		4.58		1.77		2.16		0.34

Les résultats concernant la mesure des absorbances à 420, 520 et 620 nm n'indiquent pas de différence importante entre les modalités CT et UV pour les vins de Cabernet sauvignon, Merlot, Syrah, Grenache et Pinot noir. Cependant, une tendance à la diminution des absorbances à 520 et 620 nm a été observée dans la modalité UV du vin de Malbec.

La valeur L* correspond à la clarté de l'échantillon, ce paramètre est directement lié à la sensation visuelle de luminosité. Une diminution de la clarté pour les vins de Cabernet sauvignon (-1.10), Syrah (-1.50) et Grenache (-0.20), a pu être observée dans les vins traités aux UV-C. Très légère augmentation dans les vins de Merlot (0.5) et de Pinot noir (0.20). Augmentation marquée de ce paramètre pour le vin de Malbec (3.70). Bien que significative nous n'avons pas d'explication à ce résultat.

Les résultats concernant le paramètre a* (composante vert-rouge) montrent une légère diminution de la teinte rouge pour les modalités UV des vins de Syrah (-0.47) et de Grenache (-0.17). Cette diminution est plus importante pour le Pinot Noir (-1.01) et fortement marquée dans le vin de Malbec (-2.41). Une diminution du paramètre a* indique une augmentation de la teinte verte ou bien une diminution de la teinte rouge des vins. Les modalités UV des vins de Merlot et de Cabernet sauvignon ne semblent pas impactées pour ce paramètre.

Une augmentation du paramètre b* (composante bleu-jaune) est observée dans l'ensemble des vins traités aux UV-C. Ceci correspond à une augmentation de la teinte jaune ou une diminution de la teinte bleue de la couleur des vins. Ces modifications peuvent s'expliquer par des phénomènes d'oxydation ou de dégradation de composés colorants bleus. L'absorbance

à 420 nm étant stable dans l'ensemble des vins, l'augmentation du paramètre b* semble être principalement liée à une diminution de la teinte bleue et donc potentiellement à la dégradation de pigments présents dans les vins.

Le paramètre ΔE correspond à la différence colorimétrique globale entre les différentes modalités, une valeur de ΔE supérieure ou égale à 3 indique une différence de couleur perceptible l'œil nu (Martinez et., 2001). Concernant ce paramètre, le traitement UV-C n'a induit une modification perceptible de la couleur que pour le vin de Malbec ($\Delta E = 4.58$).

L'ensemble de ces résultats sont présentés ci-dessous (Tableau 14).

II.1.2. Anthocyanes moléculaires

Pour chacun des six vins rouges les teneurs en 12 anthocyanes moléculaires ont été déterminées dans les modalités CT et UV (analyses réalisées en duplicatas). Les résultats sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Teneurs (mg.L⁻¹ équivalent malvidine-3-O-glucoside) en anthocyanes moléculaires après 6 de conservation des vins de Merlot, Cabernet sauvignon, Syrah, Pinot noir, Malbec et Grenache avec et sans traitement aux UV-C.

	Vin	CT	UV	%Var		Vin	CT	UV	%Var
M3oG (mg.L ⁻¹)	CS	150.83 ± 0.61 a	143.68 ± 1.01 b	-4.7	C3oG (mg.L ⁻¹)	CS	3,11 ± 0,27 a	2,97 ± 0,05 a	-4,5
	M	88,25 ± 2,17 a	80,95 ± 0,52 b	-8,3		M	4,12 ± 0,24 a	3,67 ± 0,12 a	-11,1
	PN	56,3 ± 0,33 a	48,6 ± 0,07 b	-13,7		PN	1 ± 0,02 a	0,88 ± 0,01 b	-12
	SYR	111,79 ± 0,01 a	110,54 ± 0,43 a	-1,1		SYR	0,85 ± 0,01 a	0,9 ± 0,13 a	5,2
	GR	69,57 ± 0,1 a	64,74 ± 0,25 b	-6,9		GR	0,33 ± 0,05 a	0,34 ± 0,02 a	3,6
	MB	43,13 ± 0,03 a	34,84 ± 0,1 b	-19,2		MB	0,97 ± 0,08 a	0,98 ± 0,05 a	1,3
M3oAG (mg.L ⁻¹)	CS	65,37 ± 0,26 a	60,91 ± 0,43 b	-6,8	C3oAG (mg.L ⁻¹)	CS	4,09 ± 0,31 a	4,2 ± 0,67 a	2,7
	M	21.54 ± 0.41 a	19.6 ± 0.22 b	-9		M	2.97 ± 0.05 a	2.41 ± 0.02 b	-18.7
	PN	0 ± 0	0 ± 0	0		PN	0.71 ± 0.07 a	0.77 ± 0.08 a	8.7
	SYR	40.82 ± 0.2 a	40.91 ± 0.03 a	0.2		SYR	1.87 ± 0.04 a	1.74 ± 0.16 a	-6.7
	GR	8.27 ± 0.01 a	7.69 ± 0.06 b	-7		GR	0.34 ± 0.07 a	0.24 ± 0.04 a	-29.7
	MB	7.23 ± 0.01 a	6 ± 0.03 b	-17.1		MB	1.86 ± 0.05 a	1.83 ± 0.28 a	-1.3
M3oCG (mg.L ⁻¹)	CS	11.37 ± 0.05 a	9.64 ± 0.22 b	-15.3	D3oG (mg.L ⁻¹)	CS	68.33 ± 0.95 a	66.79 ± 1.38 a	-2.3
	M	7.55 ± 0.38 a	6.02 ± 0.08 b	-20.2		M	31.52 ± 1.04 a	28.73 ± 0.48 a	-8.8
	PN	0 ± 0	0 ± 0	0		PN	4.45 ± 0.12 a	3.74 ± 0.07 b	-16
	SYR	12.93 ± 0.18 a	11.43 ± 0.11 b	-11.6		SYR	9.92 ± 0.03 a	9.83 ± 0.16 a	-0.9
	GR	6.67 ± 0.18 a	4.97 ± 0.07 b	-25.5		GR	6.31 ± 0.27 a	5.81 ± 0.14 a	-7.8
	MB	3.33 ± 0.08 a	2.79 ± 0.13 b	-16.3		MB	8.3 ± 0.01 a	7.42 ± 0.09 b	-10.6
Peo3oG (mg.L ⁻¹)	CS	10.99 ± 0.5 a	10.75 ± 0.68 a	-2.2	D3oAG (mg.L ⁻¹)	CS	23.99 ± 0.3 a	23.91 ± 0.2 a	-0.3
	M	14.35 ± 0.57 a	12.8 ± 0.06 a	-10.8		M	9.56 ± 0.5 a	8.76 ± 0.13 a	-8.4
	PN	10.27 ± 0.1 a	9.04 ± 0.01 b	-11.9		PN	1.44 ± 0.08 a	1.24 ± 0.03 a	-13.9
	SYR	9.55 ± 0.29 a	9.69 ± 0.23 a	1.5		SYR	5.04 ± 0.03 a	5.37 ± 0.33 a	6.6
	GR	3.95 ± 0.15 a	3.01 ± 0.25 b	-23.9		GR	1.09 ± 0.16 a	1.09 ± 0.02 a	0
	MB	5.38 ± 0 a	4.63 ± 0.02 b	-14		MB	4.19 ± 0.36 a	4.03 ± 0.35 a	-3.9
Peo3oAG (mg.L ⁻¹)	CS	5.87 ± 0.21 a	5.65 ± 0.08 a	-3.9	Pet3oG (mg.L ⁻¹)	CS	41.19 ± 0.86 a	39.77 ± 0.75 a	-3.4
	M	4.29 ± 0 a	3.95 ± 0.1 b	-7.8		M	26.61 ± 0.52 a	24.67 ± 0.39 b	-7.3
	PN	0 ± 0	0 ± 0	0		PN	5.94 ± 0.01 a	5.22 ± 0.05 b	-12.2
	SYR	7.07 ± 0.83 a	7.37 ± 0.23 a	4.2		SYR	15.78 ± 0.14 a	15.5 ± 0.17 a	-1.8
	GR	1.05 ± 0.05 a	0.96 ± 0.13 a	-8.4		GR	8.59 ± 0.06 a	8.15 ± 0.06 a	-5.1

	MB	0.72 ± 0.11 a	0.65 ± 0.14 a	-9.9		MB	9.14 ± 0.08 a	7.34 ± 0.06 b	-19.6
Peo3oCG (mg.L ⁻¹)	CS	1.86 ± 0.02 a	1.81 ± 0.16 a	-2.5	Pet3oAG (mg.L ⁻¹)	CS	12.84 ± 0.56 a	11.51 ± 0.23 a	-10.4
	M	2.77 ± 0.13 a	2.25 ± 0.01 b	-18.7		M	4.55 ± 0.1 a	4.05 ± 0 b	-10.9
	PN	0 ± 0	0 ± 0	0		PN	0.94 ± 0.15 a	0.95 ± 0.06 a	0.7
	SYR	4.04 ± 0.03 a	3.46 ± 0 b	-14.4		SYR	4.57 ± 0.35 a	4.03 ± 0.05 a	-11.8
	GR	0.94 ± 0.14 a	0.65 ± 0.04 a	-31.6		GR	1.03 ± 0.13 a	1.08 ± 0 a	4.8
	MB	0.75 ± 0.02 a	0.62 ± 0.02 b	-17.1		MB	0.34 ± 0.08 a	0.67 ± 0.21 a	97

		CT	UV	%Var
Total	CS	399.86 ± 4.17 a	381.6 ± 4.24 b	-4.6
	M	218.08 ± 6.01 a	197.86 ± 1.03 b	-9.3
	PN	81.05 ± 0.88 a	70.44 ± 0.15 b	-13.1
	SYR	224.24 ± 0.79 a	220.76 ± 1.11 a	-1.6
	GR	108.14 ± 0.61 a	98.72 ± 0.2 b	-8.7
	MB	85.32 ± 0.35 a	71.8 ± 0.17 b	-15.9

(M : Merlot, CS : Cabernet sauvignon, PN : Pinot noir, MB : Malbec, SYR : Syrah, GR : Grenache) (M3oG : malvidine-3-O-glucosid), M3oAG : malvidine-3-O-acétylglucoside, M3oCG : malvidine-3-O-coumarylglucoside, Peo3oG : péonidine-3-O-glucoside, Peo3oAG : péonidine-3-O-acétylglucoside, Peo3oCG : péonidine-3-O-coumarylglucoside, C3oG : cyanidine-3-O-glucoside, C3oAG : cyanidine-3-O-acétylglucoside, D3oG : delphinidine-3-O-glucoside, D3oAG : delphinidine-3-O-acétylglucoside, Pet3oG : pétunidine-3-O-glucoside, Pet3oAG : pétunidine-3-O-acétylglucoside).

Des concentrations significativement plus faibles des formes 3-O-glucoside, 3-O-acétylglucoside et 3-O-coumarylglucoside de la malvidine (composé anthocyanique majoritaire) ont été mesurées dans l'ensemble des vins traités aux UV-C à l'exception du vin de Syrah. Ces résultats concordent avec les résultats totaux (sommés des 12 composés anthocyaniques), pour lesquelles une teneur significativement plus faible a été mesurée dans l'ensemble des vins traités aux UV-C à l'exception du vin de Syrah. En termes de pourcentage de diminution, la composition anthocyanique du vin de Syrah semble être la moins impactée suite au traitement UV-C avec une diminution de 1,55% (soit 3,61 mg.L⁻¹), suivie de celle du Cabernet sauvignon avec 4,6% (soit 18,26 mg.L⁻¹), du Grenache avec 8,7% (soit 9,42 mg.L⁻¹), du Merlot avec 9,3% (soit 20,22 mg.L⁻¹), du Pinot Noir avec 13,1% (soit 10,61 mg.L⁻¹) et enfin du Malbec avec une diminution de 15,9% (soit 13,52 mg.L⁻¹). Malgré des différences observées au niveau de la réponse au traitement entre les cépages et les composés quantifiés, une tendance générale à la diminution suite à l'exposition au rayonnement UV-C est observée. Ces résultats démontrent une dégradation des composés anthocyaniques significativement plus importantes dans les vins traités par rayonnement UV-C.

II.1.3. Composition volatile

II.1.3.1. Dosage des esters HS-SPME/GC-MS

Le dosage des esters a été réalisé par HS-SPME/GC-MS (Chapitre 2 : Matériels et méthodes, partie II.5.1) sur l'ensemble des vins et pour les deux modalités de traitement. Ces analyses ont été réalisées en duplicatas, 6 mois après la réalisation des traitements UV-C. Cette méthode permet la quantification de 32 esters, cependant, les résultats présentés ci-dessous (Tableau 16) ne présentent que les composés pour lesquels une différence significative a été observée entre les deux modalités de traitement. Les variations observées suite au traitement UV-C sont essentiellement des diminutions faibles mais parfois significatives. Le vin de Malbec traité par rayonnement UV-C présentait cependant, des teneurs significativement plus importantes en acétate d'héxyle (descripteur : poire, seuil olfactif 670 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans le vin), décanoate de méthyle (descripteur : noix de coco) et décanoate d'éthyle (descripteurs : cireux, savon, fruité ; seuil olfactif 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en solution modèle).

Tableau 16 : Concentrations des esters (en $\mu\text{g.L}^{-1}$) significativement impactés ($\alpha=5\%$) suites au traitement UV-C dans les vins de Merlot, Cabernet sauvignon, Syrah, Pinot noir, Malbec et Grenache 6 mois après traitement.

Vin		CT	UV
Cabernet sauvignon	Aucun		
Merlot	Cinnamate d'éthyle	0.46 ± 0.04	0.29 ± 0.01
Syrah	Isovalérate d'éthyle	8.12 ± 0.21	7.36 ± 0.13
	Cinnamate d'éthyle	0.32 ± 0.01	0.21 ± 0
Pinot noir	Cinnamate d'éthyle	9.95 ± 1.42	4.94 ± 0.67
Grenache	Acétate d'octyle	0.08 ± 0	0.07 ± 0
	Dodécanoate d'éthyle	109.01 ± 1.88	98.21 ± 0.95
	Dihydrocinnamate d'éthyle	0.78 ± 0.03	0.88 ± 0.01
	Cinnamate d'éthyle	0.23 ± 0.01	0.15 ± 0.02
Malbec	Isobutyrate d'éthyle	268.8 ± 0.33	265.39 ± 0.19
	Butyrate d'éthyle	126.02 ± 0.12	123.91 ± 0.38
	Acétate d'hexyle	1.76 ± 0.01	2.01 ± 0.06
	Décanoate de méthyle	0.09 ± 0	0.13 ± 0.01
	Décanoate d'éthyle	33.91 ± 0.33	42.59 ± 1.75
	Cinnamate d'éthyle	0.53 ± 0.01	0.31 ± 0.01
		$\mu\text{g.L}^{-1}$	$\mu\text{g.L}^{-1}$

Parmi les composés dont les concentrations sont significativement différentes entre les modalités CT et UV, le cinnamate d'éthyle est le seul dont une diminution significative est observée systématiquement. Le cinnamate d'éthyle est très absorbant dans la région UV du spectre électromagnétique et est connu pour sa capacité à agir comme un écran solaire (Purwaningsih et al., 2020). De telles propriétés pourraient expliquer un niveau de réactivité plus élevé avec le rayonnement UV-C qui pourrait conduire à sa dégradation. Le cinnamate d'éthyle est un ester cinnamique décrit avec une odeur de cerise, de figue, florale et fruitée. Son seuil de perception est de 1.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (en solution modèle ; Ferreira et al., 2000) et il a été

identifié comme un contributeur aromatique important des vins de Pinot Noir (Moio et al., 1995). Le traitement UV-C a induit une diminution de 50.4 % de la concentration en cinnamate d'éthyle dans le vin de Pinot noir, et des réductions de l'ordre de 20 à 30% de ce composé dans les autres vins.

II.1.3.2. Dosages par GC-FID

La méthode chromatographique par GC-FID (Chapitre 2 : Matériels et méthodes, partie II.5.2) permet le dosage du méthanol, de l'acétate d'éthyle, de l'éthanal et des alcools supérieurs suivants le propan-1-ol, le 2-méthylpropanol, le butan-1-ol et les alcools isoamyliques. Ces analyses ont été réalisées sur l'ensemble des vins et pour les deux modalités de traitement. Ces analyses ont été réalisées en duplicatas, 6 mois après la réalisation des traitements UV-C. Les résultats de ces analyses n'ont révélé aucune différence significative entre les deux modalités de traitement pour l'ensemble des vins et l'ensemble des composés analysés.

II.1.3.3. Thiols, composés C13-norisoprénoides et marqueurs d'oxydation

17 composés volatils supplémentaires ont été dosés dans les vins 6 mois après traitement. Parmi ces 17 composés dosés, 6 sont des thiols (3SH, 4MSP, E2SA, FFT, BM et A-3SH), 2 des composés C13-norisoprénoides (β -ionone et β -damascénone), 6 sont des lactones (lilac lactone, γ -octalactone, γ -nonalactone, γ -décalactone, δ -décalactone, massoia lactone) et 3 sont des marqueurs d'oxydations connus en œnologie (méthional, phénylacétaldéhyde et 2-AAP). Les descripteurs aromatiques ainsi que les seuils olfactifs respectifs de ces composés sont détaillés ci-dessous

Tableau 17 : Descripteurs aromatiques et seuils olfactifs des composés volatils dosés dans les vins rouges. (VB : vin blanc ; VR : vin rouge ; SM ; solution modèle).

(1) Allamy Lucile, 2015 ; (2) Darriet et al., 1995 ; (3) Darriet et Pons 2017 ; (4) Engel et al., 1988 ; (5) Nikolantolaki Maria, 2010 ; (6) Pineau et al., 2007 ; (7) Poitou Xavier, 2016 ; (8) Ribéreau-Gayon et al., 2006 ; (9) Stamatopoulos Panagiotis, 2007 ; (10) Sarrazin et al., 2007 ; (11) Tominaga et al., 2000 ; (12) Tominaga et al., 1998.

Composés	Descripteurs	Seuils olfactifs
4MSP	Buis pipi de chat	0.8 ng.L ⁻¹ SM 500 ng.L ⁻¹ VB et VR ^(2, 7, 12)
E2SA	Sueur	200 ng.L ⁻¹ VB ⁽⁴⁾
FFT	Torréfié	0.4 ng.L ⁻¹ SM ^(1, 11)
Benzyl Mercaptan	Empyreumatique	0.3 ng.L ⁻¹ SM ⁽⁸⁾
A3SH	Passion Pamplémousse buis	4 ng.L ⁻¹ SM (2, 12)
3SH	Pamplémousse passion	60 ng.L ⁻¹ SM 12 μ g.L ⁻¹ VB ^(2, 12)
β-damascénone	Floral	4-5 μ g.L ⁻¹ VB et VR ^(6, 8, 9)
β-ionone	Violette	1.5- 2.5 μ g.L ⁻¹ VB et VR ⁽⁸⁾

γ-octalactone	Sucré noix de coco coumarine	8 µg.L ⁻¹ SM ^(4,9)
γ-nonalactone	Pêche	60 µg.L ⁻¹ VR ^(3,1)
γ-décalactone	Pêche	10 µg.L ⁻¹ SM ⁽¹⁾
δ-décalactone	Noix de coco vanille pêche	100 µg.L ⁻¹ VR ⁽¹⁾
Lilac lactone	Fruité menthéolé	
Massoia Lactone	Fruits cuits	18 µg.L ⁻¹ SM ⁽¹⁾
Phénylacétaldéhyde	Rose fanée	70 µg.L ⁻¹ VB ^(1,10)
Methional	Pomme de terre bouillie	2.4 µg.L ⁻¹ SM ⁽¹⁰⁾
2-AAP	Naphtaline	0.9-1 µg.L ⁻¹ VB et VR ⁽³⁾

Il est nécessaire de préciser que ces résultats découlent d'analyses non répétées, ayant pour objectif d'identifier dans un premier temps des composés potentiellement sensibles au rayonnement UV-C ou bien des marqueurs d'oxydation et de vieillissement prématuré qui seraient apparus suite au traitement des vins. De plus, les résultats concernant l'impact du procédé UV-C n'ont pas pu être obtenus pour le Pinot noir. Les résultats de ces analyses préliminaires sont présentés ci-dessous (Tableau 18).

Tableau 18 : Concentrations en différents thiols volatils, composés C13-norisoprénoïdes, lactones et marqueurs d'oxydation dans les vins de Cabernet sauvignon, Merlot, Syrah, Malbec et Grenache (6mois après traitement UV-C).

	MB		M		CS		SYR		GR		
	CT	UV	CT	UV	CT	UV	CT	UV	CT	UV	
3SH	600.81	592.44	1447.95	2187.43	1239.67	2643.13	1979.54	2564.93	1478.83	1540.44	ng.L ⁻¹
A3SH	0.84	0.82	0.66	0.1	0.12	0.26	0.14	0.49	1.26	0.14	ng.L ⁻¹
4MSP	4.79	3.87	5.74	2.86	0.66	0.59	2.03	0.78	1.55	2.05	ng.L ⁻¹
E2SA	1889.71	2018.95	2631.27	2182.15	826.46	1010	1113.87	1986.35	3643.48	2931.31	ng.L ⁻¹
FFT	32.82	34.97	46.75	45.67	41.18	35.96	139.49	135.41	38.93	49.57	ng.L ⁻¹
BM	88.81	62.26	149.62	114.6	124.66	293.68	112.19	102.77	106.54	137.21	ng.L ⁻¹
β-damascenone	1.91	1.64	4.65	3.94	4.21	5.08	2.88	2.67	4.65	4.17	µg.L ⁻¹
β-ionone	0.25	0.19	0.21	0.18	0.17	0.21	0.22	0.2	0.2	0.15	µg.L ⁻¹
Lilac lactone	4.97	5.02	2.72	2.87	2.67	3.35	4.9	4.87	8.56	7.98	µg.L ⁻¹
Massoia lactone	3.75	0	1.73	1.35	0	0	0	0	0.6	0.68	µg.L ⁻¹
γ-octalactone	3.03	2.86	1.41	1.23	1.63	2.36	2.78	3	5.16	4.89	µg.L ⁻¹
γ-nonalactone	29.34	25.75	10.69	10.45	12.84	17.57	19.95	22.84	25.5	21.03	µg.L ⁻¹
γ-decalactone	2.23	1.81	1.21	1.24	1.56	2.27	2.57	2.46	4.08	3.37	µg.L ⁻¹
δ-decalactone	16.29	15.78	10.15	10.5	15.97	21.91	24.49	37.51	44.96	34.39	µg.L ⁻¹
Methional	3.98	1.35	1.78	2.23	0.97	1.89	2.66	1.4	1.18	1.78	µg.L ⁻¹
Phenylacetaldehyde	14.27	10.33	11.47	13.94	13.97	32.49	9.94	7.88	7.59	7.18	µg.L ⁻¹
2-AAP	0.15	0.42	0.44	0.7	0.65	1.72	0.63	1.12	1.01	1.43	µg.L ⁻¹

Concernant les différents thiols et lactones, en raison du caractère aléatoire des variations observées entre les différents cépages (et de l'absence de significativité de ces analyses) aucune tendance ne se dégage de ces premières observations.

Pour l'ensemble des vins, le traitement UV-C ne semble pas avoir impacté les teneurs en β -ionone et β -damascénone. Concernant les marqueurs d'oxydation, on peut noter des teneurs plus importantes en méthional et phénylacétaldéhyde dans les vins de Merlot et de Cabernet sauvignon traités aux UV-C. Enfin une tendance commune à l'ensemble des vins semble se dégager pour la 2-AAP. En effet, ce marqueur de vieillissement prématuré présente des concentrations systématiquement plus élevées dans les vins traités aux UV-C parfois supérieures à son seuil de perception dans les vins (Merlot et Syrah). Une augmentation de ce composé dans les vins suite à des traitement UV-C a déjà été observée par (Diesler et al., 2019 ; Golombek et al., 2021). En raison de l'absence de répétitions ces constats ne permettent pas de conclure sur un éventuel impact du procédé UV-C vis-à-vis de ce composé. Ces analyses devront être réalisées à nouveau, cependant, une attention particulière sera portée aux teneurs en 2-AAP dans les vins étant donné la tendance observée.

II.1.4. Analyse sensorielle

Pour chaque vin, les deux modalités de traitement (CT et UV) ont été comparées via un test triangulaire visuel, olfactif et gustatif. Les résultats (Tableau 19) n'ont montré aucune différence significative (au seuil $\alpha = 5\%$) entre les modalités CT et UV pour les vins de Cabernet sauvignon, Merlot, Syrah, Pinot noir, et Grenache.

Les deux modalités de traitement pour le vin de Malbec ont cependant, été perçues significativement différentes par le panel de dégustateur. En raison de la nature du test réalisé, il n'est pour l'instant pas possible d'identifier les caractères qui ont permis de discriminer le vin témoin et le vin traité aux UV-C. Des séances d'analyse sensorielle basées sur la réalisation de profils aromatiques seront réalisées afin de déterminer les descripteurs permettant de différencier les deux modalités de traitement pour ce vin.

Tableau 19 Résultats des tests triangulaires réalisés pour les vins de Merlot, Cabernet sauvignon, Syrah, Pinot noir, Grenache et Malbec (n : Nombre de dégustateur).

Vin	Test	n	Bonnes réponses	Seuil de significativité ($\alpha=5\%$)	Résultat
Merlot	CTvsUV	20	10	11	NS
Cabernet sauvignon	CTvsUV	20	8	11	NS
Syrah	CTvsUV	20	4	11	NS
Pinot noir	CTvsUV	20	5	11	NS
Grenache	CTvsUV	20	9	11	NS
Malbec	CTvsUV	20	11	11	S

II.2. Vins blancs et rosé

Les résultats présentés dans cette partie concernent la caractérisation de l'impact d'un traitement UV-C à 1200 J.L⁻¹ sur 3 vins blancs issus de cépages variés (Sauvignon blanc, Chardonnay et Gewurztraminer) ainsi qu'un vin rosé. Cette dose UV-C a été choisie car pertinente pour la stabilisation microbiologique de ce type de vin « faiblement » absorbant. Les paramètres standards, la couleur, la composition phénolique moléculaire et les teneurs en certains composés volatils ont été comparés entre une modalité traitée aux UV-C (1200 J.L⁻¹) et une modalité contrôle qui correspond au vin circulé dans l'appareil en l'absence de traitement UV-C.

II.2.1. Paramètres standards et couleur

Les analyses des différents paramètres standards n'ont pas révélé de différence entre les vins contrôles et les vins traités aux UV-C (Tableau 20).

Tableau 20 : Paramètres standards 6 mois après traitement : Sauvignon blanc, Gewurztraminer, Chardonnay et du rosé de Provence avec et sans traitement aux UV-C.

	Sauvignon blanc		Gewurztraminer		Chardonnay		Rosé Provence	
	CT	UV	CT	UV	CT	UV	CT	UV
AT	3.78	3.86	2.33	2.11	3.54	3.32	1.74	2.10
AV	0.19	0.18	0.35	0.37	0.30	0.32	0.31	0.27
TAV	12.97	12.96	13.28	13.27	12.00	11.88	12.32	12.34
pH	3.50	3.53	3.38	3.35	3.19	3.19	3.25	3.25
SO2 Libre	15.80	16.50	19.90	18.30	8.90	7.20	2.00	0.00
SO2 Total	83.00	84.00	119.00	112.00	52.00	45.00	109.00	105.00

Les résultats concernant l'analyse colorimétrique des vins sont présentés ci-dessous (Tableau 21).

Tableau 21 : Absorbances à 420, 520 et 620 nm et paramètres colorimétriques (CIELab) des vins de Sauvignon blanc, Gewurztraminer, Chardonnay et du rosé de Provence après 6 mois de conservation.

	Sauvignon blanc		Gewurztraminer		Chardonnay		Rosé Provence	
	CT	UV	CT	UV	CT	UV	CT	UV
DO420	0.141	0.138	0.058	0.059	0.153	0.171	0.167	0.187
DO520	0.050	0.047	0.012	0.011	0.045	0.055	0.091	0.105
DO620	0.022	0.022	0.006	0.004	0.021	0.030	0.020	0.031
L*	96.300	96.500	98.800	99.200	96.333	95.700	94.600	93.400
a*	-0.400	-0.620	-0.170	-0.670	-1.203	-0.947	3.480	3.460
b*	8.770	8.580	3.220	3.820	8.483	9.210	9.420	9.930
ΔE		0.353		0.877		0.998		1.304

Les résultats concernant la mesure des absorbances à 420nm n'indiquent pas de différence importante entre les modalités CT et UV pour du Sauvignon blanc et du Gewurztraminer. Une augmentation de ce paramètre est observée pour le Chardonnay et le rosé de Provence. Pour le rosé, une augmentation des absorbances à 520 nm et 620 nm est également observée. Une valeur plus élevée du paramètre L*(clarté) a été mesurée pour les modalités UV du Sauvignon blanc et du Gewurztraminer. Inversement, le Chardonnay et le rosé présente une clarté plus faible dans la modalité UV avec des diminutions respectives de 0.6 et 1, par rapport aux vins contrôles. L'ensemble des paramètres colorimétriques ne montrent pas de variations importantes entre les vins contrôles et les vins traités aux UV-C. En effet, pour les 4 vins, les modalités CT et UV ne présentent pas de différence colorimétrique visible à l'œil nu ($\Delta E < 3$). Les valeurs les plus élevées de ΔE sont obtenus pour le Chardonnay et le rosé de Provence, avec respectivement des valeurs de 0.998 et 1.304. Ces valeurs semblent essentiellement liées aux diminutions de clarté observées précédemment dans les modalités UV de ces vins.

II.2.2. Composition volatile

II.2.2.1. Dosage des esters

Le dosage des esters a été réalisé par HS-SPME/GC-MS (Chapitre 2 : Matériels et méthodes, partie II.5.1) sur l'ensemble des vins et pour les deux modalités de traitement. Ces analyses ont été réalisées en duplicatas, 6 mois après la réalisation des traitements UV-C. Cette méthode permet la quantification de 32 esters, cependant, les résultats présentés ci-dessous (Tableau 22) ne présentent que les composés pour lesquels une différence significative a été observée entre les deux modalités de traitement.

Tableau 22 : Concentrations des esters significativement impactés ($\alpha=5\%$) suites au traitement UV-C dans les vins de Sauvignon blanc, Gewurztraminer, Chardonnay et du rosé de Provence 6 mois après traitement.

Vin		CT	UV
Sauvignon blanc	Isobutyrate d'éthyle	40 ± 0.21	43.12 ± 0.52
	Acétate de butyle	6.27 ± 0.04	6.8 ± 0.02
	Valérate d'éthyle	62.98 ± 0.97	68.46 ± 0.76
	Phénylacétate d'éthyle	0.48 ± 0.01	0.52 ± 0.01
	Acétate de 2-phényléthyle	219.98 ± 0.49	236.88 ± 0.62
	Dihydrocinnamate d'éthyle	0.31 ± 0	0.34 ± 0.01
	Cinnamate d'éthyle	0.11 ± 0.01	0.07 ± 0
Chardonnay	Cinnamate d'éthyle	2.41 ± 0.01	1.09 ± 0.03
Gewurztraminer	Acétate d'isobutyle	34.34 ± 0.2	32.09 ± 0.2

	Butyrate d'éthyle	366.73 ± 4.31	342.75 ± 1.37
	Méthyle trans-géranate	0.13 ± 0	0.11 ± 0.01
	Cinnamate d'éthyle	0.3 ± 0.01	0.16 ± 0
Rosé de Provence	Aucun		
		µg.L ⁻¹	µg.L ⁻¹

Mise à part des concentrations significativement supérieures en acétate de butyle (solvant, fruité), phénylacétate d'éthyle (floral, mimosa, fruité, olive) et acétate de 2-phényléthyle (floral, rose, vineux) dans la modalité UV du Sauvignon blanc, les différences significatives concernent des teneurs significativement plus faibles en esters variés dans les vins. Ces différences significatives restent cependant, faibles. Parmi ces composés dont les concentrations sont significativement différentes entre les modalités CT et UV, le cinnamate d'éthyle est à nouveau le seul dont une diminution significative est observée de façon récurrente. Ce résultat confirme les observations faites précédemment sur les vins rouges vis-à-vis de la sensibilité de ce composé au rayonnement UV-C.

II.2.2.2. Dosages par GC-FID

La méthode chromatographique par GC-FID (Chapitre 2 : Matériels et méthodes, partie II.5.2) permet le dosage du méthanol, de l'acétate d'éthyle, de l'éthanal et des alcools supérieurs suivants le propan-1-ol, le 2-méthylpropanol, le butan-1-ol et les alcools isoamyliques. Ces analyses ont été réalisées sur l'ensemble des vins et pour les deux modalités de traitement. Ces analyses ont été réalisées en duplicatas, 6 mois après la réalisation des traitements UV-C. Les résultats concernant la quantification de ces composés n'ont démontré aucune différence significative entre les modalités UV et CT.

II.2.2.3. Thiols, composés C13-norisoprénoides et marqueurs d'oxydation

11 composés volatils supplémentaires ont été dosés dans les vins 6 mois après traitement. Parmi ces 11 composés dosés, 6 sont des thiols (3SH, 4MSP, E2SA, FFT et A-3SH), 2 des composés C13-norisoprénoides (β -ionone et β -damascénone) et 3 sont des marqueurs d'oxydations connus en œnologie (méthional, phénylacétaldéhyde et ortho-aminoacétophénone). Les descripteurs aromatiques ainsi que les seuils olfactifs respectifs de ces composés sont détaillés ci-dessous (Tableau 23).

Tableau 23 : Descripteurs aromatiques et seuils de perception olfactifs des composés dosés pour les vins blancs et le rosé.

(1) Allamy Lucile, 2015 ; (2) Darriet et al., 1995 ; (3) Darriet et Pons 2017 ;(4) Engel et al., 1988 ; (5) Nikolantolaki Maria, 2010 ; (6) Pineau et al., 2007 ; (7) Poitou Xavier, 2016 ; (8) Ribéreau-Gayon et al., 2006 ; (9) Stamatopoulos Panagiotis, 2007 ; (10) Sarrazin et al., 2007 ; (11) Tominaga et al., 2000 ;(12) Tominaga et al., 1998.

Composés	Descripteurs	Seuils olfactifs
4MSP	Buis pipi de chat	0.8 ng.L ⁻¹ SM 500 ng.L ⁻¹ VB et VR ^(2, 7, 12)
E2SA	Sueur	200 ng.L ⁻¹ VB ⁽⁴⁾
FFT	Torréfié	0.4 ng.L ⁻¹ SM ^(1, 11)
Benzyl Mercaptan	Empyreumatique	0.3 ng.L ⁻¹ SM ⁽⁸⁾
A3SH	Passion Pamplemousse buis	4 ng.L ⁻¹ SM (2, 12)
3SH	Pamplemousse passion	60 ng.L ⁻¹ SM 12 µg.L ⁻¹ VB ^(2, 12)
β-damascénone	Floral	4-5 µg.L ⁻¹ VB et VR ^(6, 8, 9)
β-ionone	Violette	1.5- 2.5 µg.L ⁻¹ VB et VR ⁽⁸⁾
Phénylacétaldéhyde	Rose fanée	70 µg.L ⁻¹ VB ^(1, 10)
Methional	Pomme de terre bouillie	2.4 µg.L ⁻¹ SM ⁽¹⁰⁾
2-AAP	Naphtaline	0.9-1 µg.L ⁻¹ VB et VR ⁽³⁾

Il est nécessaire de préciser que ces résultats découlent d'analyses non répétées, ayant pour objectif d'identifier dans un premier temps des composés potentiellement sensibles au rayonnement UV-C ou bien des marqueurs d'oxydation et de vieillissement prématuré qui seraient apparus suite au traitement des vins. Les résultats de ces analyses préliminaires sont présentés dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Concentrations en différents thiols volatils, composés C13-norisoprénoïdes et marqueurs d'oxydation dans les vins de Chardonnay, Sauvignon blanc, Gewürztraminer et le rosé de Provence (6mois après traitement UV-C).

	Chardonnay		Rosé de Provence		Gewurztraminer		Sauvignon blanc		
	CT	UV	CT	UV	CT	UV	CT	UV	
3SH	283.41	151.25	75.13	84.68	219.92	210.49	486.06	578.81	ng.L ⁻¹
4MSP	0.6	0	0	0.38	0	0	23.59	18.28	ng.L ⁻¹
E2SA	156.9	7.69	16.21	0	0	0	64.33	62.59	ng.L ⁻¹
FFT	5.4	9.97	9.75	12.12	5.36	5.16	22.53	20.44	ng.L ⁻¹
A-3SH	8.19	6.22	7.57	8.3	5.06	8.21	7.71	5.08	ng.L ⁻¹
Benzenemethanethiol	33.64	44.12	9.29	15.61	5.03	6.37	11.87	15.41	ng.L ⁻¹
β-damascénone	3.52	3.74	1.68	1.62	1.05	1.03	1.63	1.42	µg.L ⁻¹
β-ionone	1.83	1.83	1.84	1.84	1.82	1.83	1.84	1.85	µg.L ⁻¹
Méthional	1.01	0.96	1.87	4.41	1.23	1.86	0.89	0.87	µg.L ⁻¹
Phénylacétaldéhyde	12.24	14.39	11.95	16.25	9.48	12.56	8.2	8.46	µg.L ⁻¹
Ortho-aminoacétophénone	1.14	1.34	1.03	1.1	1.04	1.08	0.99	0.98	µg.L ⁻¹

Concernant le 3SH, la 4MMP, l'E2SA, l'A-3SH et le FFT aucune tendance générale ne semble se dégager vis-à-vis de l'impact du procédé sur ces composés. En revanche, on peut observer des concentrations systématiquement plus importantes en benzèneméthanethiol dans les modalités UV-C de chacun des vins (avec des augmentations de 85 % pour le Chardonnay, 68% pour le rosé de Provence, 28 % et 29 % pour le Gewürztraminer et le Sauvignon blanc). Une tendance similaire est observée pour le phénylacétaldéhyde (+ 35 % pour le rosé ; + 32 % pour le Gewürztraminer ; +18 % pour le Chardonnay ; +4 % pour le Sauvignon blanc). Les traitements UV-C ne semblent pas avoir induit de modification des teneurs en composés C13-norisoprénoïdes (β -ionone et β -damascénone) dans les vins. Ces analyses préliminaires penchent en faveur d'un impact du traitement sur la composition volatile des vins étudiés. En raison de l'absence de répétitions ces constats ne permettent pas de conclure sur un éventuel impact significatif du procédé UV-C. Ces analyses devront être réalisées à nouveau, cependant, une attention particulière sera portée aux teneurs en benzèneméthanethiols ainsi qu'en phénylacétaldéhyde qui malgré l'absence de significativité montrent des concentrations plus élevées dans les modalités traitées aux UV-C.

II.2.3. Analyse sensorielle

Pour chaque vin, les deux modalités de traitement (CT et UV) ont été comparés via un test triangulaire visuel, olfactif et gustatif. Les résultats (Tableau 25) n'ont montré aucune différence significative (au seuil $\alpha = 5\%$) entre les modalités CT et UV pour le rosé de Provence ainsi que les vins de Sauvignon blanc et de Gewurztraminer.

Les deux modalités de traitement pour le vin de Chardonnay ont cependant, été perçues significativement différentes par le panel de dégustateur. En raison de la nature du test réalisé, il n'est pour l'instant pas possible d'identifier les caractères qui ont permis de discriminer le vin contrôle et le vin traité aux UV-C. Des séances d'analyse sensorielle basées sur la réalisation de profils aromatiques seront réalisées afin de déterminer les descripteurs permettant de différencier les deux modalités de traitement pour ce vin.

Tableau 25 Résultats des tests triangulaires réalisés pour les vins de Sauvignon blanc, Chardonnay, Gewurztraminer et le rosé de Provence (n : Nombre de dégustateur).

Vin	Test	n	Bonnes réponses	Seuil de significativité ($\alpha=5\%$)	Résultat
Sauvignon blanc	CTvsUV	42	15	20	NS
Gewurztraminer	CTvsUV	20	7	11	NS
Chardonnay	CTvsUV	20	12	11	S
Rosé	CTvsUV	20	10	11	NS

II.3. Discussion et conclusion

Pour l'ensemble des 10 vins étudiés, les traitements UV-C ne semblent pas avoir impacté les paramètres standards (pH, AT, AV et TAV). Les traitements n'ont induit une modification perceptible à l'œil nu de la couleur ($\Delta E > 3$) que pour le vin de Malbec qui se trouve être le vin le plus impacté du point de vue de sa composition anthocyanique. Pour les autres vins rouges, une diminution significative des teneurs en anthocyanes est également observée (à l'exception du vin de Syrah). L'étude colorimétrique ne révèle pas de phénomène oxydatif important dans les vins mais un potentiel impact du traitement sur leur clarté qui n'est pour le moment pas expliqué.

Concernant la composition volatile des vins traités aux UV-C, les tendances suivantes ont été observées. L'impact du procédé UV-C sur les esters a révélé des modifications variées et le plus souvent de faible intensité. Cependant, parmi les 32 esters étudiés, des teneurs significativement plus faibles du cinnamate d'éthyle dans 8 des 10 vins traités aux UV-C ont été mesurées. En effet, parmi les variations observées pour différents esters, seule le cinnamate d'éthyle était systématiquement présent à une quantité plus faible dans les modalités UV des 10 vins étudiés (différence significative pour 8 des 10 vins). Connue pour sa haute absorbance UV, le cinnamate d'éthyle entre dans la composition de certains écrans solaires. Ce composé est considéré comme un contributeur aromatique important des vins de Pinot noir, une diminution de sa concentration dans les autres vins n'implique pas de modification majeure de leur profil aromatique. Parce que le cinnamate d'éthyle est photosensible et qu'il est l'un des contributeurs principaux à l'arôme des vins de Pinot noir, il est un parfait exemple de composé qui pourrait à lui seul conférer à un cépage spécifique une sensibilité supérieure au traitement UV-C. Dans notre cas, malgré une concentration en cinnamate d'éthyle deux fois moins importante dans le Pinot noir traité par rayonnement UV-C, les deux modalités de traitement pour ce vin n'ont pas pu être différenciées par analyse sensorielle. Un composé proche, le dihydrocinnamate d'éthyle, lui aussi quantifié dans les vins n'a quant à lui pas montré de réponse particulière au traitement UV-C.

En complément, des analyses préliminaires concernant l'impact du procédé sur des thiols volatils, des lactones, des composés C13-norisoprénoides et différents marqueurs d'oxydation et de vieillissement prématuré ont été réalisées. Malgré une absence de répétitions pour ces analyses des premières tendances ont pu être observées. Pour les vins blancs et le rosé, d'une

manière générale les vins traités aux UV-C présentent des teneurs en benzène, méthanthiol et phénylacétaldéhyde plus importantes. Ces mêmes analyses sur les vins rouges, semblent indiquer un impact moins marqué du rayonnement malgré l'intensité plus élevées des traitements réalisés sur ces vins. Parmi les différentes tendances observées, une seule est commune à l'ensemble des vins rouges. En effet, pour ces vins des teneurs plus importantes en 2-AAP ont été observées dans l'ensemble des modalités UV. L'augmentation de ce marqueur du vieillissement prématuré a déjà été observée dans des vins blancs traités avec des doses supérieures à 6 kJ.L^{-1} (Diesler et al., 2019 ; Golombek et al, 2021). Les analyses réalisées pour la quantification des thiols, des lactones, des composés C-13 norisoprénoïdes et des marqueurs d'oxydation ou de vieillissement prématuré ne permettent cependant que d'observer des tendances, en effet, l'absence de répétitions ne permet pas de conclure sur l'impact du procédé UV-C vis-à-vis de ces composés. Ces analyses devront être effectuées à nouveau sur l'ensemble des vins afin de confirmer ou d'infirmer de manière significative les tendances observées.

Des réponses différentes au traitement UV-C ont été observées entre les cépages. Le Malbec et le Chardonnay semblent présenter un profil plus sensible au rayonnement UV-C démontré par les analyses chimiques et sensorielles. Une des pistes pour expliquer cette sensibilité accrue pourrait être la présence à des concentrations plus importantes de photosensibilisateurs tels que la riboflavine ou des teneurs moins importantes en composés phénoliques conférant une protection plus faible vis-à-vis du rayonnement et des phénomènes oxydatifs. Le profil aromatique de chaque vin est la résultante d'un équilibre très spécifique qui peut être plus ou moins perturbé par le rayonnement en fonction de la diversité des composés qui le composent ainsi que des teneurs respectives de ces différents composés. Ainsi un vin dont le profil aromatique est dominé majoritairement par des composés photosensibles ou sensibles aux phénomènes oxydatifs indirects est plus susceptible de se voir impacté par le traitement UV-C. Dans notre cas, le traitement UV-C des vins de Chardonnay et de Malbec a conduit à une modification significative d'un point de vue sensoriel de ces vins. Malgré l'observation de différences entre les vins traités et les vins contrôles, ces modifications de la composition n'ont été perçues au niveau sensoriel que pour deux des dix vins sélectionnés dans cette étude. Ces vins seront à nouveau analysés chimiquement et

sensoriellement après une période de conservation de 12 mois. Ces analyses permettront de confirmer ou d'infirmer les observations faites à 6 mois et d'évaluer le potentiel de vieillissement des vins traités par rayonnement UV-C

CHAPITRE VI : Stabilisation microbiologique par traitement UV-C d'un vin rouge et caractérisation de l'impact du procédé

I. Introduction générale

Dans cette partie, l'utilisation du procédé UV-C pour la stabilisation microbiologique d'un vin rouge a été évalué au cours d'un traitement à échelle semi-industrielle (3,5 hl). Un pilote mis au point au laboratoire au cours du projet a été utilisé afin d'évaluer l'efficacité et l'impact du procédé sur un vin rouge fortement absorbant et contaminé naturellement par des populations indigènes de levures et de bactéries.

Le pilote UV-C utilisé permet l'apport de doses UV-C allant jusqu'à 6400 J.L^{-1} en un seul passage à un débit de 200 L.h^{-1} . Afin de d'évaluer l'intensité de traitement nécessaire pour la stabilisation microbiologique de ce type de vin, des traitement UV-C d'intensités croissantes (0, 3200, 4000, 4800, 5600 et 6400 J.L^{-1}) ont été appliqués. Un suivi microbiologique a été réalisé dans l'ensemble des modalités avec des dénombrements des populations de levures et de bactéries totales immédiatement après les différents traitements puis après 30 et 90 jours de conservation. L'impact des différentes doses UV-C sur la couleur, la composition phénolique et la composition volatile des vins traités a également été évalué. Enfin, des séances d'analyse sensorielle (tests triangulaires) ont été réalisées afin de déterminer une éventuelle différence perceptible à la dégustation entre la modalité contrôle (0 J.L^{-1}) et les deux vins traités avec les doses UV-C les plus importantes (5600 J.L^{-1} et 6400 J.L^{-1}).

Ce travail a permis de (i) de valider l'efficacité du traitement UV-C pour la stabilisation microbiologique de levures et bactéries indigènes dans un vin fortement absorbant ; (ii) d'évaluer l'impact de différentes doses UV-C sur les propriétés organoleptiques de ce vin et enfin (iii) de réaliser un essai de stabilisation microbiologique à échelle semi-industrielle au moyen du pilote de traitement UV-C mis au point tout au long du projet.

II. Présentation des résultats

UV-C treatment of Bordeaux red wine: Microbial stabilization efficiency and impact on phenolic and volatile composition.

Abstract

In this study, UV-C treatments conducted at a semi-industrial scale were investigated to inactivate microorganisms on 3.5 hL of a highly absorbent ($\alpha_{254} = 49.6 \text{ cm}^{-1}$) and naturally contaminated Bordeaux red wine. The aim was to evaluate the efficiency of different UV-C doses and their respective effects on chemical and sensory wine properties. UV-C doses from 3200 to 6400 J.L^{-1} were applied to the wine and resulted in 0.98 to 2.7 log reduction of total yeast population right after treatments. MALDI-TOFF analyzes one month after treatments revealed *B. bruxellensis* populations lower than 10 CFU.mL⁻¹ in all UV-C treated wines when the untreated wine presented a population around 10⁵ UFC.mL⁻¹. Three months after treatments total yeast populations in UV-C treated wines were similar to the one measured in the control wine (around 10⁴ UFC.mL⁻¹), except for the wine treated with 6400 J.L^{-1} in which the yeast population remained around 10³ UFC.mL⁻¹. Similar results were observed for the total bacteria population in wines. Colorimetric analyzes did not show any significant difference between control wine and UV-C treated wines, except for the lower UV-C dose 3200 J.L^{-1} . GC-MS analysis revealed a significant decrease of ethyl cinnamate in UV-C treated wines and LC-MS a slight but significant decrease of various phenolic compounds. Sensorial analyzes carried out by triangular tests did not reveal any significant difference between the control wine and the two most UV-C treated wines (4600 J.L^{-1} and 6400 J.L^{-1}) 3 months after treatments. UV-C provided sufficient microbial inactivation without having a sensorial impact as examined by the triangular test. However, microbial analyzes 3 months after UV-C treatments revealed high levels of population even in UV-C treated wines. Thus, it would be interesting to evaluate both the efficiency and the impact of consecutive UV-C treatments on wine microbial stability and quality.

Key words: UV-C; red wine; *B. bruxellensis*; organoleptic properties

II.1. Introduction

Microbial activity plays a major role during winemaking, from alcoholic and malolactic fermentations to aging and bottling. However, certain species can cause defects, such as *Brettanomyces bruxellensis* yeast associated with volatile phenol production (Chatonnet et al., 1992), or *Acetobacter aceti* bacteria associated with acid acetic production (Du Toit and Pretorius, 2000). Microbial population control is therefore a key parameter during the whole winemaking process. Wine stabilization is mainly managed by using sulfur dioxide (SO₂) due to both its antimicrobial and antioxidant properties. Nevertheless, on the first hand due to health concerns and a growing consumer preference for wines with the least possible added input, the trend is going towards the reduction of added inputs in wine, especially sulfite usage. On the other hand, because of the emergence of sulfite resistant strains amongst spoilers (Avramova et al., 2018) and climate change increasing wine's pH (Darriet et Van Leeuwen, 2016), strongest sulfite doses are and will be required to achieve the same antimicrobial efficiency in wines. In order to offer new solutions for microbial stabilization to winemakers, new chemical and physical methods are intensively studied (Lisanti et al. 2019) Among the non-thermal food decontamination processes, UV-C treatment demonstrates interesting perspectives, especially for its low cost and energy consumption compared to other processes (Junqua et al., 2020). UV-C treatment (254 nm) could be an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines during the whole winemaking process. This technology has been widely investigated for two decades and is regarded as a promising approach for fruit juice stabilization with minimal negative impacts. Microbial inactivation caused by UV-C radiation is based on the rearrangement of the microorganism's nucleic acid and DNA-protein cross link (Cyclobutane Pyrimidine Dimers) which directly interferes with the ability of microorganisms to reproduce (Sinha et al., 2002). Different studies evaluated its germicidal effectiveness on contaminated wines and showed a wide spectrum of inactivation of wine-associated microorganisms in different types of wines and grape juices. Junqua et al (2020) realized several experiments at semi-industrial scale using a coiled reactor with optimized flow parameters. Authors proved that chemical and sensorial analysis performed on Merlot red wine (UV-C doses up to 2610 J.L⁻¹) and Gros Manseng sweet white wine (UVc doses up to 1740 J.L⁻¹) did not show any significant differences after one year of conservation. However, with their process, the small diameter of

the tubes induces high pressure drop (meaning higher energy consumption for pumping) and they concluded that improvements on the physical design of the reactor are required.

In this study, at first hand thanks to an optimized home-made apparatus, we propose to evaluate the efficiency of different UV-C treatments on a highly absorbent and naturally contaminated aging Bordeaux red wine. Then, we also evaluated the impact of those various UV-C treatments on both the phenolic and aromatic composition of this wine.

II.2. Materials et methods

II.2.1. Red wine

In this study 350 L of aging 2018 Bordeaux red wine were used. This wine was selected for its low free SO₂ concentration and its important microbial populations. Untreated control and UV treated modalities were stored at 12 °C in 20 L inerted tanks (nitrogen gas) to protect them from oxidation. After treatments, wines were bottled and stored at 12 °C for further analysis.

II.2.2. UV-C treatments

The UV treatment device consists of 16 modules. Each module consists of a low-pressure mercury lamp with maximum peak radiation at 254 nm, surrounded by a quartz sleeve (Suzhou Xicheng Water Treatment Equipment, China). A food-grade fluorinated ethylene propylene (FEP) tube (Serto S.A.R.L, France), was coiled around the quartz sleeve. Due to the curvature of the pipe and hydrodynamic conditions applied, Dean vortices are generated allowing a homogenous treatment (Junqua et al, 2020). The wine flow rate in the pipe was 200 L.h⁻¹ and the applied dose by the circulation in one module was 400 J.L⁻¹. The method used to evaluate the applied UV dose is described in (Müller et al, 2014). Six different modalities were studied, the untreated control wine (0 J.L⁻¹) and five different UV-C doses (3200 J.L⁻¹, 4000 J.L⁻¹, 4800 J.L⁻¹, 5600 J.L⁻¹, and 6400 J.L⁻¹). After treatments, each modality was stored in inerted 20l drums before bottling.

II.2.3. Microbiological analyzes

Samples were collected for total yeast and total bacteria enumeration right after treatment, after 1 month in a bottle and after 3 months in bottle for each modality. Microbial counts were determined in triplicates by plating serial 10-fold dilutions of the samples. 100 µL of each, was then plated in 9cm diameter petri dishes. Total yeast were enumerated on YPD plates with

chloramphenicol (0.1 mg.mL⁻¹) and biphenyl (0.15 mg.mL⁻¹) after 7 days of incubation at 27 °C. Total bacteria were enumerated on grape juice plates with pimaricin (0.1 mg.mL⁻¹) and biphenyl (0.15 mg.mL⁻¹) after 10 days of incubation at 25 °C. The number of colonies counted was expressed in CFU.mL⁻¹ and the limit of detection was 1 CFU.mL⁻¹. Non-saccharomyces yeasts enumeration and MALDI-TOF identification of *B. bruxellensis* (on 5 clones) were also performed in wines at 1 and 3 months after bottling. Those analyzes were carried out by MICROFLORA® (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Villenave d'Ornon, France).

II.2.4. Wines standard parameters

Free SO₂, total SO₂, pH, total acidity and volatile acidity were measured using the Y15 Enzymatic Autoanalyzer (Biosystems S.A, Barcelona, Spain). The total alcoholometric volumetric title was measured using a WineScan Analyzer (FOSS). Analyzes were only performed once.

II.2.5. Absorbance coefficient at 254nm

The wine's absorption coefficient (α) at $\lambda = 254$ nm was determined from the slope of a linear plot of liquid absorbance *A* (UV-Vis Helios Alpha™ spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, MA, USA) versus path length (*l*) of quartz cuvettes (1, 5 and 10 mm). Each measurement was performed in triplicates.

II.2.6. Chromatic parameters

Absorbance at 420, 520 and 620 nm were measured in a 1mm path length cuvette by a UV-Vis Helios Alpha™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, MA, USA). Further to direct measurement of absorbance of the wines at 420, 520 and 620 nm, the following variables were calculated: color intensity as the sum of 420 nm, 520 nm and 620 nm absorbances; tint as proportion of the absorbance measured at 420 nm and 520 nm. Color was determined by direct colorimetric reading and the results were expressed as Tint (or Hue) and color intensity (CI). Each measurement was performed in triplicates. Chromatic parameters (Glories, 1984) were calculated as follows:

$$CI' = 10 (A_{420nm} + A_{520nm} + A_{620nm})$$

$$Hue = A_{420nm} / A_{520nm}$$

$$yellow\% = (10 \times 100 \times A_{420nm})/CI'$$

$$red\% = (10 \times 100 \times A_{520nm})/CI'$$

$$purple\% = (10 \times 100 \times A_{620nm})/CI'$$

II.2.7. Colorimetry

The different calculations were realized from the measured absorbance at 450, 520, 570 and 630 nm in a 1 mm path length cuvette (UV-Vis Helios Alpha™ spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, MA, USA) using the free available MSCV software (<https://www.unirioja.es/color/descargas.shtml>). The L*a*b* color space describes all perceivable colors mathematically in a three-dimensional space: L* for lightness, from 0 (black) to 100 (transparent), and a* and b* for the color opponents green–red and blue–yellow, from -300 to 299. Color differences (ΔE^*ab) between two color points in the CIELAB space are calculated as the Euclidean distance between their locations in the three-dimensional space defined by L*, a*, and b*. Thus, mathematically, they are calculated by applying the formula:

$$\Delta E^*ab = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

According to Martínez et al. (2001) ΔE values above 3 CIE Lab Units (C.U.) represent chromatic changes commonly perceived by the human eye.

II.2.8. Proanthocyanin monomers and oligomers quantification

Wines were filtered (0,45 μ m) and directly injected for HPLC analyses. The equipment used for HPLC analysis consisted of a Thermo-Finnigan UV-Visible detector (UV-vis 200), a Thermo-Finnigan auto sampler and a Thermo-Finnigan (San Jose, CA, USA) ternary pump coupled to a Xcalibur data treatment system. Separation was performed on a reverse-phase column Lichrosphere 100-RP18 (250 mm x 2 mm, 5 μ m; Merck, France) column. The mobile phases were water-acidified with formic acid 0.5 % (solvent A) and acetonitrile-acidified with formic acid 0.5 % (solvent B). The gradient at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ was 3 % B for 3 min, 3 to 5 % B for 11 min, 5 to 10 % B for 8 min, 10 to 14 % B for 4 min, 14 to 25 % B for 14 min, 25 to 100 % B for 1 min, 100 % B for 7 min, 100 to 3 % B for 2 min, and 3 % B for 5 min. Eluting peaks were monitored by a UV-detector at 280 nm and a fluo-detector ($\lambda_{excitation} = 280$ nm, $\lambda_{emission} = 320$ nm).

nm). Calibration curves were established using the catechin as external standard. The results were expressed as milligrams of catechin equivalents per liter. Analyzes were carried out in duplicates

II.2.9. Anthocyanin quantification

Wines were filtered (0.45 μm) and directly injected for HPLC analyses. HPLC-UV analyses were performed by means of a Thermo Scientific Accela (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with an Accela 600 pump module and a UV-Visible diode array detector and Xcalibur Software according to González-Centeno et al. (2017). Separation was performed on a reverse-phase C18 Nucleosil column (250 x 4.6 mm, 5 μm). The injected volume was 20 μL . The mobile phases were water/formic acid (95:5, v/v) (solvent A) and acetonitrile/formic acid (95:5, v/v) (solvent B), at a flow rate of 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Initial solvent B was set at 10 %. The mobile phase gradient was as follows: 35 % B at 25 min, 100 % B at 35 min, 100 % B from 35 to 40 min, 10 % B at 41 min, and then 10 % B for 4 min before the next injection. Eluting peaks were monitored at 520 nm. Concentrations were expressed as milligrams of malvidin 3-*O*-glucoside equivalents per liter. Analyzes were carried out in duplicates.

II.2.10. Ester quantification by HS-SPME / GC-MS

Ten milliliters of wine were placed in a flask for SPME filled with 3.5 g of NaCl. The wine was added with 10 μL of a mixture of deuterated internal standards (ethyl butyrate-4,4,4- d_3 at 178 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ethyl hexanoate- d_{11} at 209 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ethyl octanoate- d_{15} at 223 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and trans-ethyl cinnamate- d_5 at 325 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in ethanol). The bottle for SPME was crimped with a cap fitted with a double-sided Teflon septum and then vortexed for a few seconds. Adsorption was performed with a PDMS fiber (100 μm film thickness; length of 1 cm) at 40 $^\circ\text{C}$ during 30 minutes with stirring speed of 500 rpm. Desorption was performed for 15 minutes in split/splitless mode (15 s) with the injector temperature set at 250 $^\circ\text{C}$. The column used was a BP21 (SGE; 30 m x 0,32 mm x 0,25 μm). The chromatograph used was an Agilent 6890N (Agilent technologies, Massy, France) equipped with a Gerstel MPS2 automatic sample changer. The temperature program was the following: 40 $^\circ\text{C}$ for 5 minutes, then 5 $^\circ\text{C}$ per minute up to 220 $^\circ\text{C}$ and finally 220 $^\circ\text{C}$ maintained for 30 minutes. The gas carrier was helium at a flow rate of 1.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. This device was coupled to a 5975C mass spectrometer (Agilent technologies, Massy, France) operating on electronic impact (70 eV) at a source temperature

of 280 °C. The detection of the different esters was done in SIM mode. Analyzes were performed in triplicates.

II.2.11. GC-FID analyzes

This analysis was carried out by direct injection of 0.5 µl of a mixture of 5 mL of wine supplemented with 50 µl an internal standard solution (4-methylpentan-2-ol at 10 g.L⁻¹ in hydroalcoholic solution). The temperature of the injector was 200 °C (split injection, division ratio 1/60). The apparatus used was an Agilent 6890N chromatograph equipped with an Agilent CPWAX 57 CB column (50 m x 0.25 mm; 0.2 µm film thickness, Agilent). The carrier gas was hydrogen 5.5 at a flow rate of 2 mL.min⁻¹. The temperature program was the following: 40 °C for 5 minutes then 4 °C per minute up to 200 °C. The detector used was a flame ionization detector (FID), set at 240 °C. This method allows the quantification of methanol, ethyl acetate, ethanal, propan-1-ol, 2-methylpropanol, butan-1-ol and isoamyl alcohols. Analyzes were carried out in triplicate.

II.2.12. Sensory analyzes – Triangular tests

Sensory analyses were performed as follow. Samples were evaluated at controlled room temperature (20 °C), in individual booths, using ISO tasting glasses containing about 25 mL of liquid. The 32 panelists selected for their availability, level of training and interest were research laboratory staff from the oenology research laboratory of the Institute of Vine and Wine Sciences at Bordeaux University (Unité de Recherche Œnologie, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Université de Bordeaux). Triangular tests were performed in a three-alternative way. For each triangular test, three randomly numbered samples were presented in random order: two identical and one different. Each judge could use direct visual, olfactory and tasting perception to identify the sample perceived as different in each test and had to give an answer, even if s/he was not sure. Each judge had to realize two tests in which the untreated wine was opposed to wines treated with 5600 J.L⁻¹ and 6400 J.L⁻¹. The results of all of the triangular tests were then statistically analyzed according to the NF EN ISO 4120:2007 standard, based on the binomial law corresponding to the distribution of answers in this type of test.

II.3. Results and discussion

II.3.1. Microbial stabilization

Microbiological analyzes revealed a high population of both yeasts ($4.26 \log_{10} \text{CFU.mL}^{-1}$) and bacteria ($2.56 \log_{10} \text{CFU.mL}^{-1}$) in the wine before UV-C treatments. After treatments (Day 0), a range of 0.98 to $2.7 \log_{10}$ reduction was achieved for total yeasts corresponding to a range of 35.7% to 98.7% of elimination right after UV-C treatments. Cell count one month after UV-C treatments (Day 30) showed similar levels of total yeasts population than those observed right after UV-C treatments except in the control wine and the UV-C treated wine with 6400 J.L^{-1} . In the control wine, during the first month, total yeast population increased from $4.26 \log_{10} \text{CFU.mL}^{-1}$ to $5.23 \log_{10} \text{CFU.mL}^{-1}$. These results show that UV-C treatments were able to reduce yeasts populations and to inhibit their growth during the first month without SO_2 addition. MALDI-TOF identification of *B. bruxellensis* (at day 30) among non-*Saccharomyces* (NS) yeasts in wines revealed that all UV-C treatments reduced *B. bruxellensis* populations under 10CFU.mL^{-1} (Tableau 26). This result indicates that a treatment with 3200 J.L^{-1} were sufficient to get rid of *B. bruxellensis* in the wines, and that the decrease of the total yeast population observed with higher UV-C doses is mainly due to the inhibition of *Saccharomyces* species.

Tableau 26 : MALDI-TOFF identification of *B. bruxellensis* among NS yeasts one month after UV-C treatments.

UV-C dose (J.L^{-1})	Total yeasts (CFU.mL^{-1})	NS yeasts (CFU.mL^{-1})	<i>B. bruxellensis</i> among NS yeasts (MALDI -TOF)
0	1.70E+05	1.20E+05	5/5
3200	2.00E+03	5.00E+00	5/5
4000	1.00E+03	1.00E+00	5/5
4800	2.70E+02	2.00E+00	5/5
5600	4.80E+02	4.00E+00	5/5
6400	5.00E+01	3.60E+01	5/5

Finally, cell counts three months after UV-C treatments (Day 90) revealed important yeasts growth in every modality (Figure 49). Indeed, total yeasts populations in UV-C treated wines with 3200, 4000, 4800 and 5600 J.L^{-1} reached population levels similar to the one observed in the control wine.

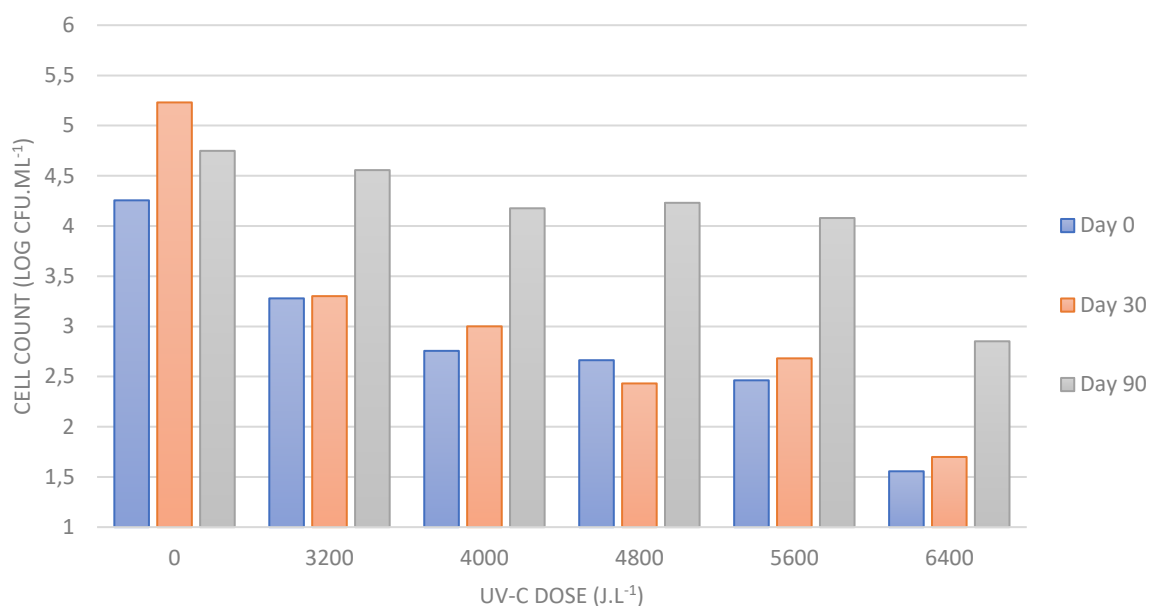


Figure 49 : Total yeasts enumeration in control and UV-C treated wines immediately after treatments (day 0), after 30 days (day 30) and after 90 days (day90).

NS yeasts enumeration and MALDI-TOFF analyzes revealed important growth of *B. bruxellensis* in those wines between the first and the third month (Tableau 27). Three months after UV-C treatments, the wine which received 6400 J.L⁻¹ still had the lowest yeast population even if *B. bruxellensis* growth also occurred in this modality.

Tableau 27 : MALDI-TOFF identification of *B. bruxellensis* among NS yeasts three months after UV-C treatments.

UV-C dose (J.L ⁻¹)	Total yeasts (CFU.mL ⁻¹)	NS yeast (CFU.mL ⁻¹)	<i>B. bruxellensis</i> among NS yeasts (Maldi -TOFF)
0	5.60E+04	1.30E+04	5/5
3200	3.60E+04	4.70E+03	5/5
4000	1.50E+04	8.30E+03	5/5
4800	1.70E+04	1.80E+03	5/5
5600	1.20E+04	5.30E+03	5/5
6400	7.10E+02	4.30E+02	5/5

Total bacterial populations were also followed before and after treatments (Figure 50). All UV-C treatments were sufficient to achieve 2.5 log₁₀ CFU.mL⁻¹ reduction resulting in populations lower than 10 CFU.mL⁻¹ (cell count threshold) in every UV-C treated wine right after treatments. One month later, only the wine which received 6400 J.L⁻¹ presented a population higher than 10 CFU.mL⁻¹ but it remained very low (21 CFU.mL⁻¹). Three months after treatments, total bacteria populations were all equivalent to the control wine, between 10³ and 10⁴ CFU.mL⁻¹.

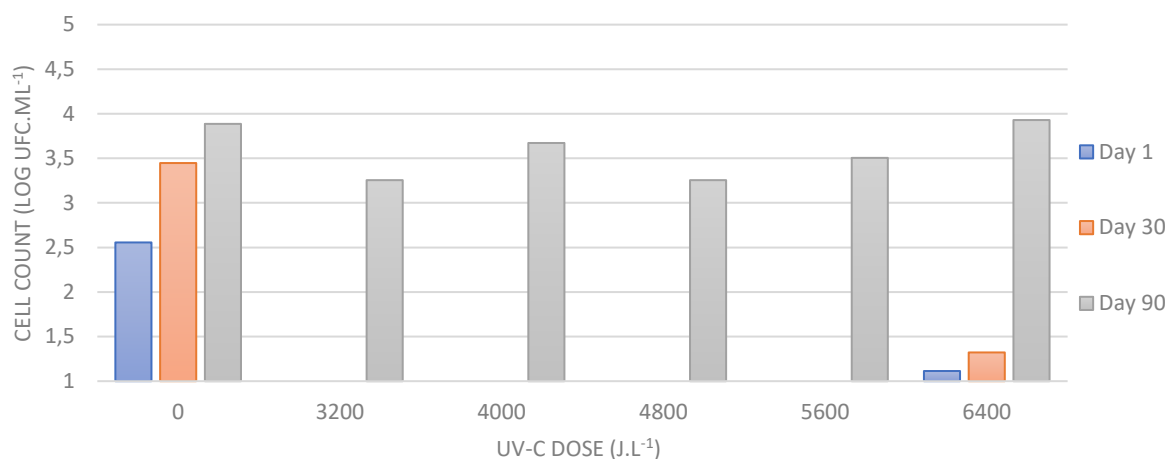


Figure 50 : Total bacteria enumeration in control and UV-C treated wines immediately after treatments (day 1), after 30 days (day 30) and after 90 days (day90).

II.3.2. Impact on wine's standard parameters

Analyses of standard parameters did not show significant differences between the treated and untreated wine even with the highest UV-C dose (6400 J.L⁻¹) (Tableau 28).

Tableau 28 : Standard parameters in control and UV-C treated wines.

UV-C Dose (J.L ⁻¹)	0 (Control)	3200	4000	4800	5600	6400
AV (g.L ⁻¹)	0.33	0.32	0.33	0.31	0.33	0.33
AT (g.L ⁻¹)	2.87	3.09	3.1	2.87	3.05	3.12
Free SO ₂ (mg.L ⁻¹)	13	14	14	14	14	12
Total SO ₂ (mg.L ⁻¹)	62	62	61	61	62	57
pH	3.65	3.62	3.63	3.63	3.61	3.62
TAV (% vol.)	13.75	13.78	13.76	13.75	13.8	13.78

II.3.3. Impact on wine's color

A significant increase in the L* parameter (brightness) has been observed across all UV-C treated modalities. Also, a significant decrease in the a* parameter (green-red tint) for the modalities treated with 4 kJ.L⁻¹ and more was measured revealing a decrease of the red tint in those wines. This observation was confirmed by the significant decrease of the OD520nm in these modalities. No significant difference in the parameter b* (blue-yellow tint) except for the modality treated with 3,2 kJ.L⁻¹. This result testifies to a strong increase in the yellow tint / decrease in the blue tint (of the order of 44%) and possible oxidation of the wine for this modality. Only the modality treated with 3,2 kJ.L⁻¹ showed a difference in color perceptible to

the naked eye compared to that of the control ($\Delta E > 3$). Results concerning the impact of UVc on wine color are presented below (Tableau 29).

Tableau 29 : CIELAB parameters and absorbance at 420, 520 and 620 nm of control and UV-C treated wines.

UV dose (J.L ⁻¹)	0 (Control)	3200	4000	4800	5600	6400
L*	35.27 ± 0.32 a	36.2 ± 0.1 b	36.1 ± 0.2 b	36.27 ± 0.12 b	36.2 ± 0.3 b	36.2 ± 0.35 b
a*	49.69 ± 0.17 a	49.88 ± 0.25 a	48.68 ± 0.18 b	48.56 ± 0.03 b	48.24 ± 0.27 b	48.17 ± 0.27 b
b*	10.21 ± 1.52 a	14.73 ± 1.21 b	9.9 ± 0.09 a	9.99 ± 0.06 a	10.03 ± 0.14 a	10.45 ± 0.35 a
D0420	0.54 ± 0 a	0.53 ± 0 b	0.55 ± 0.03 ab	0.54 ± 0 a	0.54 ± 0 a	0.54 ± 0 a
D0520	0.87 ± 0.01 a	0.86 ± 0.01 a	0.83 ± 0 b	0.83 ± 0 b	0.82 ± 0 b	0.82 ± 0 b
D0620	0.24 ± 0 a	0.23 ± 0 b	0.23 ± 0 ab	0.23 ± 0 ab	0.23 ± 0 ab	0.23 ± 0 ab
IC	16.42 ± 0.13 a	16.1 ± 0.06 b	16.19 ± 0.29 b	15.99 ± 0.03 b	15.98 ± 0.09 b	16.03 ± 0.12 b
Hue	0.62 ± 0.01 c	0.62 ± 0 c	0.67 ± 0.03 b	0.65 ± 0 ab	0.66 ± 0 ab	0.66 ± 0 a
Yellow%	32.92 ± 0.15 c	32.86 ± 0.07 c	34.18 ± 0.96 b	33.73 ± 0.08 ab	33.85 ± 0.02 ab	33.99 ± 0.03 a
Red%	52.7 ± 0.28 a	53.1 ± 0.13 a	51.41 ± 0.82 b	51.73 ± 0.05 bc	51.54 ± 0.11 bc	51.41 ± 0.1 c
Purple%	14.38 ± 0.15 abc	14.04 ± 0.06 b	14.41 ± 0.15 abc	14.54 ± 0.03 abc	14.61 ± 0.12 abc	14.6 ± 0.13 abc
ΔE	0	4.62	1.34	1.53	1.73	1.8

II.3.4. Proanthocyanins monomers and oligomers

Results obtained for the proanthocyanins monomers and oligomers (

Tableau 30) showed that flavanols monomers were the most impacted by the UV-C treatments. Indeed, for catechin and epi-catechin concentrations, all UV-C treated wines had significantly lower concentrations for those compounds compared to the control wine. And the higher the UV-C dose, the lower the concentration. The strongest UV-C treatment (6.4 kJ.L⁻¹) resulted in a loss of 5 % for both catechin and epi-catechin. The concentration of dimer B1 was different from the control wine in terms of concentration only at the highest UV-C dose while dimer B2 was different from the control with UV-C doses from 4.8 kJ.L⁻¹ to 6.4 kJ.L⁻¹. Concentrations in dimers B3 and B4 and trimers 1 and 2 did not change significantly after UV-C treatments. Finally, UV-C treatments induced a reduction of total monomeric and oligomeric tannins in wines (between 0.3 and 5 % depending on the treatment intensity), with the highest UV-C dose resulting in a slight but significant loss of 4 mg.L⁻¹ (5 %) of oligomeric tannins.

Tableau 30 : Proanthocyanins monomers and oligomers concentrations in control and UV-C treated wines (mg.L⁻¹ catechin).

UV-C dose (J.L ⁻¹)	0 (Control)	3200	4000	4800	5600	6400
Dimer B1 (mg.L ⁻¹)	14.78 ± 0.11 a	14.59 ± 0.02 a	14.62 ± 0.03 ab	14.35 ± 0.22 ab	14.42 ± 0.03 ab	14.14 ± 0.15 b
Dimer B3 (mg.L ⁻¹)	4.33 ± 0.01 a	4.1 ± 0.35 a	4.09 ± 0.04 a	3.95 ± 0.01 a	4.2 ± 0.14 a	3.98 ± 0.07 a
Catechin (mg.L ⁻¹)	50.51 ± 0.09 a	49.72 ± 0.15 b	49.55 ± 0.09 b	49.11 ± 0.11 c	48.97 ± 0.07 c	48.42 ± 0.09 d
Dimer B4 (mg.L ⁻¹)	6.12 ± 0.34 a	6.4 ± 0.1 a	6.5 ± 0 a	6.58 ± 0.23 a	6.38 ± 0.06 a	6.39 ± 0 a
Dimer B2 (mg.L ⁻¹)	11.59 ± 0.04 a	11.47 ± 0.07 ab	11.33 ± 0.02 abc	11.18 ± 0.1 bc	11.22 ± 0.17 bc	11.09 ± 0.01 c
Epicatechin (mg.L ⁻¹)	34.35 ± 0.16 a	33.73 ± 0.04 ab	33.42 ± 0.41 bc	33.23 ± 0.16 bc	33.13 ± 0.04 bc	32.65 ± 0.08 c
Trimer 1 (mg.L ⁻¹)	9.68 ± 0.03 a	10.27 ± 0.45 a	9.74 ± 0.4 a	10 ± 0.65 a	9.68 ± 0.26 a	10.48 ± 0.18 a
Trimer 2 (mg.L ⁻¹)	1.79 ± 0.06 a	1.94 ± 0.05 a	1.93 ± 0.13 a	1.73 ± 0.02 a	1.84 ± 0.17 a	1.89 ± 0.02 a
Total (mg.L ⁻¹)	133.15 ± 0.82 a	132.23 ± 0.04 ab	131.2 ± 0.05 abc	130.14 ± 1.04 bcd	129.86 ± 0.08 cd	129.04 ± 0.01 d

II.3.5. Molecular anthocyanins

UV-C treatments induced significant reductions of various monomeric anthocyanins content in wines. Malvidine-3-O-glucoside (M3OG) was the main monomeric anthocyanin affected by UV treatments. The higher the UV-C treatment intensity is, the lower the measured M3OG concentration in the resulting wine. However only the higher UV-C dose (6.4 kJ.L⁻¹) resulted in a significant reduction of its content in the wine after treatment, with a M3OG concentration loss of 5.6 mg.L⁻¹. Slight but significant decreases in peonidine-3-O-coumarylglucoside and malvidine-3-O-coumarylglucoside were also observed for treatments with doses higher than 4.8 kJ.L⁻¹. Results for the quantification of molecular anthocyanins are presented below (Tableau 31).

Tableau 31 : Molecular anthocyanins concentrations in control and UV-C treated wines (mg.L⁻¹ malvidin-3-O-glucoside).

UV-C dose (J.L ⁻¹)	0	3200	4000	4800	5600	6400
Delphinidin-3-O-glucoside	18.08 ± 0.45 a	17.62 ± 0.48 a	17.64 ± 0.15 a	17.46 ± 0.02 a	17.69 ± 0.34 a	17.23 ± 0.24 a
Cyanidin-3-O-glucoside	2.25 ± 0.04 a	2.32 ± 0.09 a	2.3 ± 0.23 a	2.34 ± 0.07 a	2.32 ± 0.05 a	2.24 ± 0.03 a
Petunidin-3-O-glucoside	18.9 ± 0.19 a	18.55 ± 0.25 a	18.84 ± 0.53 a	18.15 ± 0.37 a	18.45 ± 0.38 a	18.06 ± 0.08 a
Peonidin-3-O-glucoside	12.47 ± 0.95 a	12.18 ± 0.29 a	11.97 ± 0.08 a	11.43 ± 0.47 a	11.45 ± 0.32 a	11.69 ± 0.45 a
Malvidin-3-O-glucoside	109.83 ± 1.46 a	106.92 ± 1.18 ab	107.99 ± 0.95 ab	105.07 ± 0.95 ab	106.2 ± 1.61 ab	104.2 ± 1.07 b
Delphinidin-3-O-acetylglucoside	5.59 ± 0.03 a	5.3 ± 0.2 a	5.72 ± 0.07 a	5.09 ± 0.51 a	5.5 ± 0.07 a	5.27 ± 0.2 a
Cyanidin-3-O-acetylglucoside	1.04 ± 0.09 a	1.14 ± 0.07 a	1.03 ± 0.15 a	1.2 ± 0.11 a	1.03 ± 0.09 a	1.06 ± 0.04 a
Petunidin-3-O-acetylglucoside	3.94 ± 0.29 a	4.05 ± 0.28 a	4.21 ± 0.12 a	3.6 ± 0.32 a	3.87 ± 0.24 a	4.01 ± 0 a
Peonidin-3-O-acetylglucoside	2.38 ± 0.06 a	2.73 ± 0.16 a	2.49 ± 0.04 a	2.63 ± 0.05 a	2.74 ± 0.34 a	2.68 ± 0.25 a
Malvidin-3-O-acetylglucoside	35.73 ± 0.18 a	35.31 ± 0.49 a	35.29 ± 0.13 a	34.87 ± 0.33 a	34.85 ± 0.23 a	34.36 ± 0.5 a
Peonidin-3-O-coumaroylglucoside	1.52 ± 0.05 a	1.47 ± 0.06 ab	1.56 ± 0.05 abc	1.38 ± 0.01 bc	1.34 ± 0.02 bc	1.36 ± 0.04 c
Malvidin-3-O-coumaroylglucoside	12.95 ± 0.36 a	11.56 ± 0.26 b	11.58 ± 0.06 b	11.2 ± 0.17 bc	11.07 ± 0.11 bc	10.73 ± 0.07 c

II.3.6. Esters quantification

UV-C treatment did not induce any significant change for 31 out of the 32 quantified esters. Only ethyl cinnamate showed a significant decrease in its concentration which was correlated with the UV-C treatment intensity (Tableau 32). Treatment with 6.4 kJ.L⁻¹ resulted in the loss of 44 % of this compound in the wine (from 0.8 to 0.45 µg.L⁻¹). Ethyl cinnamate is highly absorbent in the UV region of the electromagnetic spectrum and is known for its ability to act as a sunscreen (Purwaningsih et al., 2020). Such properties could explain a higher level of reactivity with UV-C radiation which could lead to its degradation. Ethyl cinnamate is a cinnamic ester described with as cherry, fig, floral, fruity odor. Its perception threshold is 1.1 µg.L⁻¹ in synthetic wine solution (Ferreira et al., 2000) and this compound is identified as an important aromatic contributor only in Pinot Noir wines (Moio et al., 1995). No impact of treatment was found on ethyl dihydrocinnamate a compound chemically close to ethyl cinnamate as well as another important contributor to the aroma of pinot noir wines.

Tableau 32 : Ethyl cinnamate concentrations in control and UV wines.

UV-C dose (J.L ⁻¹)	Ethyl cinnamate (µg.L ⁻¹)
0	0.8 ± 0.04 a
3200	0.64 ± 0.09 ab
4000	0.55 ± 0.05 b
4800	0.57 ± 0.08 b
5600	0.54 ± 0.11 b
6400	0.45 ± 0.05 b

II.3.7. GC-FID analyzes

Among the five higher alcohols quantified (propan-1-ol; 2-methylpropan-1-ol; butan-1-ol; 2-methylbutan-1-ol and 3-methylbutan-1-ol), none of them showed significant modification of their concentration after UV-C treatments even with the highest UV-C dose. Similarly, no significant impact was revealed on ethanal, ethyl acetate and methanol concentrations (Tableau 33).

Tableau 33 : Results for GC-FID analyzes in control and UV-C treated wines.

UV-C dose (J.L ⁻¹)	0	3200	4000	4800	5600	6400
Ethanal	37.38 ± 1.26 a	37.1 ± 0.98 a	34.38 ± 1.35 a	36.69 ± 1.53 a	35.81 ± 0.92 a	35.19 ± 1.87 a
Ethyl acetate	23.62 ± 0.39 a	23.86 ± 0.12 a	23.59 ± 0.66 a	23.67 ± 0.1 a	23.55 ± 0.49 a	23.7 ± 0.37 a
Methanol	159.56 ± 5.84 a	155.1 ± 2.37 a	152.08 ± 4.43 a	154.67 ± 1.8 a	155.01 ± 3.81 a	156.32 ± 4.82 a
Propan-1-ol	20.22 ± 0.74 a	20 ± 0.07 a	19.89 ± 0.31 a	20.49 ± 0.82 a	20.05 ± 0.51 a	20.17 ± 0.42 a
2-methylpropan-1-ol	64.42 ± 0.88 a	64.02 ± 0.43 a	63.62 ± 0.92 a	63.79 ± 0.25 a	63.56 ± 0.85 a	63.73 ± 0.57 a
Butan-1-ol	2.06 ± 0.15 a	1.97 ± 0.04 a	2.08 ± 0.23 a	1.92 ± 0.07 a	2.15 ± 0.2 a	1.99 ± 0.09 a
2-methylbutan-1-ol	78.7 ± 1.24 a	82.27 ± 1.06 a	75.13 ± 2.65 a	78.59 ± 2.61 a	79.68 ± 4.12 a	77.55 ± 2.89 a
3-methylbutan-1-ol	274.77 ± 4.87 a	276.41 ± 1.5 a	268.57 ± 7.49 a	269.46 ± 2.76 a	267.66 ± 4.07 a	270.39 ± 1.74 a

II.3.8. Sensory analyzes

Control wine was compared to the wines treated with 5600 and 6400 J.L⁻¹ 3 months after UV-C treatments. Triangular tests results did not reveal any significant difference perceived by the panel even after visual, olfactory and gustative analyze. Tests results are shown below (Tableau 34). These results demonstrate the low impact of UV-C treatments applied in this study and will have to be confirmed with further sensorial analyzes after a longer time of conservation.

Tableau 34 : Triangular tests results; comparisons of control and UV-C treated wines with 5600 J.L⁻¹ and 6400 J.L⁻¹.

Triangular-test	Panelists	Threshold	Correct answers	Result ($\alpha=5\%$)
Control vs 5600 J.L ⁻¹	31	16	13	Not significant
Control vs 6400 J.L ⁻¹	31	16	14	Not significant

II.4. Discussion / Conclusion

This study evaluated both the microbial stabilization efficiency of different UV-C treatments and their impact on a naturally contaminated Bordeaux red wine. Treatments with UV-C doses from 3200 J.L⁻¹ to 6400 J.L⁻¹ were applied on a highly absorbent red wine and resulted in different levels of microbial inactivation. Concerning yeasts inactivation, depending on the UV-C doses, a range from 35.7% to 98.7% of elimination was achieved right after UV-C treatments. About bacteria, all UV-C modalities were sufficient to reach populations below 1 CFU.mL⁻¹ immediately after treatments. Yeasts and bacteria populations appeared to remain stable during the month following the UV-C treatments.

Also, one month after UV-C treatments MALDI-TOFF identification of *B. bruxellensis* (at day 30) among NS yeasts in wines revealed that all UV-C treatments reduced *B. bruxellensis* populations in wines under 10 CFU.mL⁻¹ and that greater microbial reduction observed with UV-C doses higher than 3200 J.L⁻¹ was mainly due to the elimination of *Saccharomyces* yeast species. This result is interesting and means that microbial inactivation of spoilers in very absorbent wines can be achieved with relatively low UV-C doses. After treatments yeasts and bacteria populations were stable during one month, but due to the lack of residual protection over-time, cell growth could occur after the first month.

The impact of each UV-C treatment was also evaluated. Molecular anthocyanins and procyanidins analyzes revealed a slight but significant impact of UV-C treatments on the wine's phenolic composition. This impact appeared to be positively correlated with the UV-C treatment intensity. Among the volatile compounds analyzed, only ethyl cinnamate showed a significant decrease of its concentration in UV-C treated wines. This compound known for its high absorbance in the UV region is also known to be only an important aromatic contributor in Pinot noir wines. Also, further volatile composition analyzes should be considered in order to elucidate the impact of UV-C treatments on other important aromatic compounds in wines. Finally, sensory analyzes did not reveal significant differences between the control wine and the wines treated with the 5600 J.L⁻¹ and 6400 J.L⁻¹.

III. Conclusion générale

Cette étude démontre l'efficacité du procédé UV-C pour la stabilisation microbiologique des vins même les plus absorbants. L'analyse de la composition phénolique a révélé un impact faible mais significatif des traitements sur le vin. Parmi les composés volatils étudiés, un seul composé semble avoir été impacté significativement par les traitements, le cinnamate éthyle. Les modifications observées suite à l'exposition du vin au rayonnement UV-C n'ont cependant, pas été perçues d'un point de vue sensoriel. Ces résultats confirment le fort potentiel du procédé UV-C en œnologie en générale, et dans notre cas plus particulièrement pour la stabilisation microbiologique des vins rouges au cours de l'élevage. Cette étude démontre aussi le risque de recontamination ainsi il semble pertinent d'évaluer l'impact sur les vins de traitements répétés.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Actuellement la filière vise à réduire significativement l'utilisation d'intrants chimiques et particulièrement celle du SO₂ (agriculture biologique et biodynamie mais aussi conventionnelle) utilisé notamment pour ses propriétés antioxydantes et antiseptiques. Cependant, la diminution de l'utilisation de SO₂ dans un contexte de réchauffement climatique et d'émergence de souches de microorganismes d'altération tolérantes à cette molécule entraîne un environnement de vinification de plus en plus propice aux dérives microbiologiques. La stabilisation microbiologique en œnologie est essentielle pour garantir des conditions de production et de conservation optimales. Les procédés et intrants utilisés à ce jour présentent tous des inconvénients tels que la modification des qualités organoleptiques des vins, des problématiques environnementales ou de santé publique, des coûts d'investissement et de fonctionnement conséquents ou encore une consommation énergétique importante...

Actuellement, aucun procédé n'est capable de substituer totalement le dioxyde de soufre notamment vis-à-vis de son activité antioxydante et de son action protectrice dans le temps. Cependant, des technologies innovantes de stabilisation microbiologique peuvent être considérées comme des stratégies complémentaires qui pourront à terme permettre une diminution significative des doses de SO₂. Le développement de procédés éco-innovants est essentiel afin de faire progresser la qualité de nos aliments mais également pour répondre aux attentes des consommateurs. Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse était d'évaluer la possibilité d'intégrer des procédés employant le rayonnement UV dans l'itinéraire de vinification et de les présenter en tant que compléments ou alternatives viables aux procédés existants. Afin de favoriser l'émergence de ces procédés, il est essentiel de vérifier la pertinence de leur utilisation au cours de la vinification en étudiant les points suivant :

- Valider l'efficacité du procédé sur le plus grand nombre possible de microorganismes identifiés en œnologie afin délimiter les gammes d'application de ces procédés.
- Caractériser l'impact de ces procédés sur la qualité des vins.
- Développer une compréhension fine de l'influence des différents paramètres opératoires

Au cours de ce projet différents éléments de réponses ont été apportés vis-à-vis de ces interrogations. Tout d'abord, en ce qui concerne l'étude de la sensibilité des microorganismes, une méthode innovante de criblage sur milieu solide permettant de générer et de traiter un jeu de données important a été mise au point en collaboration avec l'Axe Microbiologie de notre unité de recherche. Cette approche a permis d'évaluer les niveaux de sensibilité d'un grand nombre de souches de levures (plus de 140) vis-à-vis des UV-C et de la LP mais aussi d'étudier le niveau de variabilité interspécifique et intraspécifique de ces sensibilités. Au regard des résultats obtenus, nous pouvons tout d'abord considérer que l'ensemble des espèces de levure étudiées sont impactées par les traitements LP et UV-C. Des niveaux de variabilité important vis-à-vis de la sensibilité à ces procédés ont cependant, été révélés entre les différentes espèces de levure étudiées et au sein même de ces espèces. D'une manière générale, il apparaît que les espèces associées au vignoble présentent une sensibilité moins marquée que les espèces identifiées au cours de la vinification. Le classement des niveaux de sensibilité des différentes espèces est généralement le même pour le traitement UV-C et LP ce qui laisse à penser que l'efficacité germicide de la LP est essentiellement liée à l'effet photochimique du rayonnement. Cependant, les différences observées d'ordre de sensibilité chez certaines espèces pourraient indiquer qu'il existe un réel effet supplémentaire des mécanismes photothermiques et photophysiques liés à la plus haute intensité et au large spectre d'émission de la LP. Cette question reste à travailler et davantage de travaux doivent être réalisés dans ce sens.

Concernant la LP, cette approche sur milieu solide a permis de démontrer l'importance de certains paramètres opératoire sur l'efficacité de ce procédé. En effet, il a été observé que la fluence totale n'est corrélée à un ralentissement ou une inhibition de croissance que lorsque l'intensité de chaque flash est supérieure ou égale à une valeur seuil ($22 \mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ dans notre cas). Ce résultat démontre l'importance de la façon dont le rayonnement est appliqué au cours d'un traitement par LP et confirme l'existence d'un effet crête pour ce procédé. De plus, la modulation de la fréquence de traitement (entre 1 et 5 Hz) n'a démontré aucun effet sur l'efficacité du traitement. Cela implique que la fréquence de flash peut être augmentée (ou réduite) sans en affecter l'efficacité. Ce résultat est intéressant vis-à-vis de la diminution des temps de traitement et de la mise au point de réacteurs permettant le traitement de liquides en continu (adaptation de la fréquence au débit de traitement). Enfin, au cours de ce projet,

la caractérisation de l'impact de la LP sur le vin n'a pas pu être réalisée, il est essentiel que des travaux soient réalisés dans ce sens afin de pouvoir conclure sur la pertinence de l'intégration de ce procédé innovant au cours de la vinification.

Des résultats ont été obtenus concernant l'impact du procédé UV-C sur 10 vins aux profils variés. Ce travail a permis de démontrer une absence d'impact sur la perception sensorielle de 8 des 10 vins traités malgré l'observation de différences faibles (mais parfois significatives) sur la composition phénolique et volatile de ces vins. Plus spécifiquement, les vins issus de Chardonnay et de Malbec traités aux UV-C ont pu être différenciés des vins non traités au cours de séances d'analyses sensorielle. Ce résultat démontre un impact du procédé pour ces deux cépages. Ces observations semblent indiquer que tous les vins ne sont pas égaux vis-à-vis de leur sensibilité à l'exposition au rayonnement UV-C et que la modulation des doses UV-C en fonction du type de vins à traiter doit être envisagée. Un composé, le cinnamate d'éthyle, a pu être identifié comme étant particulièrement sensible au traitement UV-C. En effet, une diminution significative de cet ester, contributeur important de l'arôme des vins de Pinot noir, a pu être observée dans l'ensemble des vins traités aux UV-C. Cependant, il est important de noter que d'une manière générale l'impact du procédé s'est avéré faible ou inexistant sur l'ensemble des composés dosés (anthocyanes et tanins moléculaires, esters et alcools supérieurs).

Des analyses préliminaires de la composition volatile pour d'autres familles de composés (thiols, lactones, composés C13-norisoprénoïdes et marqueurs d'oxydations et de vieillissement prématuré) ont également été réalisées. Ces analyses ont permis l'observation de deux tendances qui devront être confirmées/infirmées ultérieurement par des analyses plus poussées : (i) une augmentation du benzèneméthanethiol et phénylacétaldéhyde dans les modalités UV des vins blancs et rosés (traités avec 1200 J.L^{-1}) et (ii) une augmentation de la 2-AAP dans les modalités UV des vins rouges (traités avec 6400 J.L^{-1}). Enfin, nous avons pu noter l'absence de formation des composés responsables du goût de lumière (DMDS et MeSH), même pour les doses les plus élevées utilisées dans cette étude. Ces premières observations sur les composés soufrés légers n'ont pas été présentées dans ce document et devront être confirmées au cours de travaux ultérieurs.

Il est également essentiel de noter que dans cette étude les coefficients d'absorbance de chacun des vins n'ont pas été considérés individuellement. En effet, les vins ont été séparés « arbitrairement » en deux groupes, vins blancs/rosé et vins rouges. Ainsi les matrices les plus claires ont reçu 1200 J.L^{-1} et les plus absorbantes 6400 J.L^{-1} . Par conséquent, certains de ces vins ont potentiellement reçu une dose UV-C supérieure à la dose qui se serait avérée suffisante pour leur stabilisation microbiologique. En termes d'optimisation du procédé il est primordial de mettre au point un outil d'aide à la décision sous la forme de courbes d'isodose (par exemple) indiquant une dose minimale requise pour la stabilisation microbiologique en fonction de l'absorbance du vin à traiter pour différents microorganismes cibles (bactéries, levures *Saccharomyces*, *B. bruxellensis*...). Cet outil, permettrait d'ajuster l'intensité des traitements en fonction de situations spécifiques (élimination de bactéries dans un vin fortement absorbant, mutage d'un vin liquoreux, blocage de FML d'un vin faiblement absorbant, *B. bruxellensis* dans un vin rouge...) et de limiter ainsi les risques de déviation organoleptique.

Initialement au cours de cette étude un suivi des analytique et sensoriel des vins à J0, 3 mois, 6 mois et 12 mois devait être réalisé. Cependant, en raison de l'épidémie due au COVID-19, une grande partie des analyses sensorielles et physico-chimiques planifiées ont dû être reportées et revues à la baisse, et cette étude visant à caractériser l'impact du procédé UV-C en a été impactée. L'ensemble des tendances observées et des résultats obtenus au cours de cet essai devront être confirmés après 12 mois de conservation des vins.

Enfin, des résultats complémentaires ont pu être obtenus lors d'une dernière étude réalisée au cours de ce projet. Un essai de stabilisation microbiologique à l'échelle semi-industrielle a été effectué sur un volume de 3,5 hL de vin rouge contaminé naturellement par *B. bruxellensis*. Au cours de ce traitement, différentes doses d'UV-C ont été appliquées dans le but de déterminer l'efficacité germicide et leur impact sur le vin. Dans cet essai, une dose de 3200 J.L^{-1} a permis de stabiliser le vin (populations $< 10 \text{ UFC.mL}^{-1}$) pendant un mois vis-à-vis de *B. bruxellensis* et de bactéries de genres et d'espèces non identifiées. Les doses UV-C plus importantes ont quant à elles permis l'obtention de résultats similaires tout en impactant davantage les autres espèces de levure présentes dans le milieu. Cette observation illustre

une nouvelle fois le niveau plus élevé de sensibilité de l'espèce *B. bruxellensis* vis-à-vis du traitement UV-C. Cependant, après trois mois de conservation des vins sans ajout de dioxyde de soufre, des niveaux de populations équivalent à ceux mesurés avant traitements ont pu être observés. Ce résultat démontre le risque de recontamination important et une absence de protection dans le temps du procédé UV-C. Les analyses physico-chimiques et sensorielles des différentes modalités de traitement et du vin témoin n'ont quant à elles révélé aucun impact des traitements. Nous pouvons noter tout de même des diminutions faibles mais significatives de teneurs en différents tanins et anthocyanes moléculaires notamment dans les modalités ayant reçu les traitements les plus intenses. Un impact significatif des traitements sur le cinnamate d'éthyle a pu être identifier de nouveau. Cependant, ces différences n'ont pas permis de discriminer les vins traités du vin témoin au cours de séances d'analyse sensorielle. Ces résultats indiquent un impact non significatif du procédé sur la perception sensorielle du vin malgré l'observation de modifications parfois significatives des paramètres physico-chimiques apparues suite au traitement UV-C.

Etant donné le faible impact mesuré sur la majorité des vins étudiés au cours de projet et l'efficacité germicide observée, ce procédé semble plus que pertinent pour permettre une réduction significative des quantités de SO₂ ajoutées dans les vins. Les travaux concernant l'évaluation de son impact sur les vins doivent être multipliés et son utilisation doit être évaluée dans le cas d'itinéraires complets de vinification en tant que complément à l'action du SO₂ à faible dose. Dans ce projet, les problématiques liées à une éventuelle toxicité induite par le procédé n'ont pas été abordées. Il sera nécessaire de réaliser des travaux dans ce sens afin permettre l'émergence des UV-C en œnologie. Le pilote de traitement UV-C permettant le traitement de volumes de vin importants mis au point au cours ce projet permettra de poursuivre ces travaux au cours des mois à venir. Il permettra notamment d'affiner les doses UV-C à appliquer au cas par cas en fonction des profils de vin et des espèces de microorganismes. Les prochains essais auront pour but de continuer à fournir des données permettant d'évaluer le potentiel de ce procédé en œnologie et d'identifier les optimisations nécessaires à son utilisation à l'échelle industrielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdul Karim Shah, Nor, Rosnah Shamsudin, Russly Abdul Rahman, et Noranizan Adzahan. 2016. « Fruit Juice Production Using Ultraviolet Pasteurization: A Review ». *Beverages* 2 (3): 22. <https://doi.org/10.3390/beverages2030022>.
- Aguirre, Juan S., Eva Hierro, Manuela Fernández, et Gonzalo D. García De Fernando. 2014. « Modelling the effect of light penetration and matrix colour on the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed light ». *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 26: 505-10. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.05.011>.
- Albergaria, Helena, Diana Francisco, Klaus Gori, Nils Arneborg, et Francisco Gírio. 2010. « *Saccharomyces Cerevisiae* CCM1 885 Secretes Peptides That Inhibit the Growth of Some Non-*Saccharomyces* Wine-Related Strains ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (3): 965-72. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2409-6>.
- Albertin, Warren, Laura Chasseriaud, Guillaume Comte, Aurélie Panfili, Adline Delcamp, Franck Salin, Philippe Marullo, et Marina Bely. 2014. « Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii* ». *PLoS ONE* 9 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094246>.
- Allamy, Lucile. s. d. « Recherches sur les marqueurs moléculaires de l'arôme de `` fruits cuits `` des raisins et des vins rouges issus des cépages Merlot et Cabernet-Sauvignon: Approches sensorielle, analytique et agronomique », 342.
- Alonso Ugaglia, Adeline, Jean-Marie Cardebat, et Linda Jiao. 2019. « The French Wine Industry ». In *The Palgrave Handbook of Wine Industry Economics*, édité par Adeline Alonso Ugaglia, Jean-Marie Cardebat, et Alessandro Corsi, 17-46. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98633-3_2.
- Alston, Julian M., Torey Arvik, Jarrett Hart, et James T. Lapsley. 2021. « Brettanomyces I: The Cost of Brettanomyces in California Wine Production ». *Journal of Wine Economics* 16 (1): 4-31. <https://doi.org/10.1017/jwe.2020.20>.
- Amerine, M A, et R E Kunkee. 1968. « Microbiology of Winemaking ». *Annual Review of Microbiology* 22 (1): 323-58. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.22.100168.001543>.
- Anderson, J.G., N.J. Rowan, S.J. MacGregor, R.A. Fouracre, et O. Farish. 2000. « Inactivation of food-borne enteropathogenic bacteria and spoilage fungi using pulsed-light ». *IEEE Transactions on Plasma Science* 28 (1): 83-88. <https://doi.org/10.1109/27.842870>.
- Arriagada-Carrazana, J.P., C. Sáez-Navarrete, et E. Bordeu. 2005. « Membrane Filtration Effects on Aromatic and Phenolic Quality of Cabernet Sauvignon Wines ». *Journal of Food Engineering* 68 (3): 363-68. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.06.011>.
- Artíguez, Mari L., Amaia Lasagabaster, et Inigo Martínez de Marañón. 2011. « Factors affecting microbial inactivation by Pulsed Light in a continuous flow-through unit for liquid products treatment ». *Procedia Food Science* 1: 786-91. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.119>.
- Asaduzzaman, Mohammad, Matteo Scampicchio, Franco Biasioli, Phil J Bremer, et Patrick Silcock. 2020. « Methanethiol Formation during the Photochemical Oxidation of Methionine-Riboflavin System ». *Flavour and Fragrance Journal* 35 (1): 34-41. <https://doi.org/10.1002/ffj.3536>.
- Aumer, Thomas. s. d. « Étude Du Mécanisme d'action d'un Peptide Antifongique de La Famille Des Hélicomicines Pour Contrôler Le Champignon Phytopathogène *Botrytis Cinerea* », 235.

- Avramova, Marta. s. d. « Population genetics and diversity of the species *Brettanomyces bruxellensis*: a focus on sulphite tolerance », 186.
- Avramova, Marta, Alice Cibrario, Emilien Peltier, Monika Coton, Emmanuel Coton, Joseph Schacherer, Giuseppe Spano, et al. 2018. « *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution ». *Scientific Reports* 8 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22580-7>.
- Avramova, Marta, Paul Grbin, Anthony Borneman, Warren Albertin, Isabelle Masneuf-Pomarède, et Cristian Varela. 2019. « Competition experiments between *Brettanomyces bruxellensis* strains reveal specific adaptation to sulfur dioxide and complex interactions at intraspecies level ». *FEMS Yeast Research* 19 (3): 1-9. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz010>.
- Avramova, Marta, Amélie Vallet-Courbin, Julie Maupeu, Isabelle Masneuf-Pomarède, et Warren Albertin. 2018. « Molecular Diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis*' Sulfur Dioxide Sensitivity Through Genotype Specific Method ». *Frontiers in Microbiology* 9 (JUN): 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01260>.
- Bağder Elmacı, Simel, Gökşen Gülgör, Mehmet Tokatlı, Hüseyin Erten, Aslı İşci, et Filiz Özçelik. 2015. « Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms ». *Antonie van Leeuwenhoek* 107 (3): 675-86. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0362-6>.
- Bandla, Srinivasarao, Ruplal Choudhary, Dennis G. Watson, et John Haddock. 2012. « UV-C Treatment of Soymilk in Coiled Tube UV Reactors for Inactivation of *Escherichia Coli* W1485 and *Bacillus Cereus* Endospores ». *LWT - Food Science and Technology* 46 (1): 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.024>.
- Barbosa-Canovas, Gustavo V., Donald W. Schaffner, Merle D. Pierson, et Q. Howard Zhang. 2000. « Pulsed Light Technology ». *Journal of Food Science* 65 (novembre): 82-85. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2000.tb00621.x>.
- Baroň, M., et P. Bábíková. 2011. « Saturated Higher Fatty Acids as a Means of Inhibiting Alcoholic Fermentation and Sulphur Dioxide Reduction in Wine. » *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe Und Wein, Obstbau Und Früchteverwertung* 61 (3): 158-65.
- Bartowsky, E.j. 2009. « Bacterial Spoilage of Wine and Approaches to Minimize It ». *Letters in Applied Microbiology* 48 (2): 149-56. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02505.x>.
- Bartowsky, Eveline J., Peter J. Cos^{TEL}o, Adalberto Villa, et Paul A. Henschke. 2004. « The Chemical and Sensorial Effects of Lysozyme Addition to Red and White Wines over Six Months' Cellar Storage ». *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10 (2): 143-50. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2004.tb00017.x>.
- Bartowsky, Eveline J., et Isak S. Pretorius. 2009. « Microbial Formation and Modification of Flavor and Off-Flavor Compounds in Wine ». In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, édité par Helmut König, Gottfried Uden, et Jürgen Fröhlich, 209-31. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_11.
- Bauer, Rolene, Donald A. Cowan, et Andrew Crouch. 2010. « Acrolein in Wine: Importance of 3-Hydroxypropionaldehyde and Derivatives in Production and Detection ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (6): 3243-50. <https://doi.org/10.1021/jf9041112>.
- Bautista-Ortín, Ana Belén, María Dolores Jiménez-Martínez, Ricardo Jurado, Juan Alberto Iniesta, Salvador Terrades, Ana Andrés, et Encarna Gómez-Plaza. 2017. « Application of High-Power Ultrasounds during Red Wine Vinification ». *International Journal of Food Science & Technology* 52 (6): 1314-23. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13411>.

- Baysal, Ayse Handan, Celenk Molva, et Sevcan Unluturk. 2013. « UV-C Light Inactivation and Modeling Kinetics of Alicyclobacillus Acidoterrestris Spores in White Grape and Apple Juices ». *International Journal of Food Microbiology* 166 (3): 494-98.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.015>.
- Beauchamp, S., et M. Lacroix. 2012. « Resistance of the genome of Escherichia coli and Listeria monocytogenes to irradiation evaluated by the induction of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts using gamma and UV-C radiations ». *Radiation Physics and Chemistry* 81 (8): 1193-97.
<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2011.11.007>.
- Bhavya, M L, et H Umesh Hebbar. 2017. « Pulsed light processing of foods for microbial safety ». *Food Quality and Safety* 1 (3): 187-202.
<https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx017>.
- Bintsis, Thomas, Evanthia Litopoulou-Tzanetaki, et Richard K. Robinson. 2000. « Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry - A critical review ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (6): 637-45.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000501\)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000501)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1).
- Bisquert, Ricardo, Sara Muñoz-Calvo, et José M Guillamón. 2018. « Protective role of intracellular Melatonin against oxidative stress and UV radiation in Saccharomyces cerevisiae ». *Frontiers in Microbiology* 9 (FEB): 1-11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00318>.
- Blachowicz, Adriana, Nicholas Raffa, Woo Bok, Tsokyi Choera, Benjamin Knox, et Yun Lim. 2020. « Contributions of Spore Secondary Metabolites to UV-C Protection and Virulence Vary in Different Aspergillus fumigatus Strains » 11 (1): 1-12.
<https://doi.org/doi.org/10.1128/mBio.03415-19>.
- Bohrerova, Zuzana, Hilla Shemer, Robert Lantis, Christopher A. Impellitteri, et Karl G. Linden. 2008. « Comparative disinfection efficiency of pulsed and continuous-wave UV irradiation technologies ». *Water Research* 42 (12): 2975-82.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.04.001>.
- Börlin, Marine, Olivier Claisse, Warren Albertin, Franck Salin, Jean-Luc Legras, et Isabelle Masneuf-Pomarede. 2020. « Quantifying the Effect of Human Practices on S. Cerevisiae Vineyard Metapopulation Diversity ». *Scientific Reports* 10 (1): 16214.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-73279-7>.
- Boulton, Roger B., Vernon L. Singleton, Linda F. Bisson, et Ralph E. Kunkee. 2013. *Principles and Practices of Winemaking*. Springer Science & Business Media.
- Branco, Patrícia, Farzana Sabir, Mário Diniz, Luísa Carvalho, Helena Albergaria, et Catarina Prista. 2019. « Biocontrol of Brettanomyces/Dekkera Bruxellensis in Alcoholic Fermentations Using Saccharomycin-Overproducing Saccharomyces Cerevisiae Strains ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (7): 3073-83.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09657-7>.
- Breda, Valmary van, Neil Jolly, et Jessy van Wyk. 2013. « Characterisation of commercial and natural Torulaspora delbrueckii wine yeast strains ». *International Journal of Food Microbiology* 163 (2-3): 80-88.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.011>.
- Breniaux, Marion, Philippe Renault, Fabrice Meunier, et Rémy Ghidossi. 2019. « Study of High Power Ultrasound for Oak Wood Barrel Regeneration: Impact on Wood Properties and Sanitation Effect ». *Beverages* 5 (1): 10.
<https://doi.org/10.3390/beverages5010010>.

- Buffon, Peter, Hildegard Heymann, et David E. Block. 2014. « Sensory and Chemical Effects of Cross-Flow Filtration on White and Red Wines ». *American Journal of Enology and Viticulture* 65 (3): 305-14. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.13090>.
- Buzrul, Sencer. 2012. « High Hydrostatic Pressure Treatment of Beer and Wine: A Review ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 13 (janvier): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.10.001>.
- Cadet, Jean, Thierry Delatour, Thierry Douki, Didier Gasparutto, Jean-Pierre Pouget, Jean-Luc Ravanat, et Sylvie Sauvaigo. 1999. « Hydroxyl Radicals and DNA Base Damage ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424 (1): 9-21. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00004-4).
- Catsaras, Marc. 1995. « Louis Pasteur à Lille et les fermentations ». *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 148 (4): 415-23. <https://doi.org/10.4267/2042/63984>.
- Chambers, et I. S. Pretorius. 2010. « Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research ». *EMBO reports* 11 (12): 914-20. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.179>.
- Chang, Audrey Chingzu, et Fa Chung Chen. 2002. « The Application of 20 KHz Ultrasonic Waves to Accelerate the Aging of Different Wines ». *Food Chemistry* 79 (4): 501-6. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00226-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00226-1).
- Chasseriaud, Laura, Sibylle Krieger-Weber, Magali Délérès-Bou, Nathalie Sieczkowski, Michael Jourdes, Pierre Louis Teissedre, Olivier Claisse, et Aline Lonvaud-Funel. 2015. « Hypotheses on the Effects of Enological Tannins and Total Red Wine Phenolic Compounds on *Oenococcus Oeni* ». *Food Microbiology* 52 (décembre): 131-37. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.002>.
- Chatonnet, Pascal, Denis Dubourdie, Jean-noël Boidron, et Monique Pons. 1992. « The origin of ethylphenols in wines ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60 (2): 165-78. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>.
- Chira, Kleopatra. 2009. « Structures moléculaire et perception tannique des raisins et des vins (Cabernet-Sauvignon, Merlot) du Bordelais ». Thèse de doctorat, Bordeaux 2. <https://www.theses.fr/2009BOR21656>.
- Choe, Eunok, Rongmin Huang, et David B. Min. 2005. « Chemical Reactions and Stability of Riboflavin in Foods ». *Journal of Food Science* 70 (1): R28-36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09055.x>.
- Christofi, Stefania, Dimitris Malliaris, George Katsaros, Efstathios Panagou, et Stamatina Kallithraka. 2020. « Limit SO₂ Content of Wines by Applying High Hydrostatic Pressure ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 62 (juin): 102342. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102342>.
- Cibrario, Alice, Marta Avramova, Maria Dimopoulou, Maura Magani, Cécile Miot-Sertier, Albert Mas, Maria C Portillo, et al. 2019. « *Brettanomyces bruxellensis* wine isolates show high geographical dispersal and long persistence in cellars ». Édité par Cecile Fairhead. *PLOS ONE* 14 (12): e0222749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222749>.
- Cibrario, Alice, Cécile Miot-Sertier, Margot Paulin, Bastien Bullier, Laurent Riquier, Marie-Claire Perello, Gilles de Revel, et al. 2020. « *Brettanomyces bruxellensis* phenotypic diversity, tolerance to wine stress and wine spoilage ability ». *Food Microbiology* 87 (September 2018): 103379. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103379>.
- Cocolin, Luca, Kalliopi Rantsiou, Lucilla Iacumin, Roberto Zironi, et Giuseppe Comi. 2004. « Molecular Detection and Identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in Spoiled Wines ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3): 1347-55. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1347-1355.2004>.

- « Codex Œnologique International ». OIV 2021.
<https://www.oiv.int/public/medias/7790/codex-2021-en.pdf>.
- Comitini, Francesca, Natalia Di Pietro, Laura Zacchi, Ilaria Mannazzu, Maurizio Ciani, et Maurizio Ciani. 2004. « Correspondence ».
- Comitini, Francesca, Natalia Di Pietro, Laura Zacchi, Ilaria Mannazzu, et Maurizio YR 2004 Ciani. s. d. « Kluyveromyces phaffii killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization ». *Microbiology* 150 (8): 2535-41.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.27145-0>.
- Costa, A., A. Barata, M. Malfeito-Ferreira, et V. Loureiro. 2008. « Evaluation of the Inhibitory Effect of Dimethyl Dicarbonate (DMDC) against Wine Microorganisms ». *Food Microbiology* 25 (2): 422-27. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.003>.
- Crauwels, S., A. Van Assche, R. de Jonge, A. R. Borneman, C. Verreth, P. Troels, G. De Samblanx, et al. 2015. « Comparative Phenomics and Targeted Use of Genomics Reveals Variation in Carbon and Nitrogen Assimilation among Different *Brettanomyces Bruxellensis* Strains ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (21): 9123-34. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6769-9>.
- Crauwels, Sam, Filip Van Opstaele, Barbara Jaskula-Goiris, Jan Steensels, Christel Verreth, Lien Bosmans, Caroline Paulussen, et al. 2017. « Fermentation assays reveal differences in sugar and (off-) flavor metabolism across different *Brettanomyces bruxellensis* strains ». *FEMS Yeast Research* 17 (1): 1-10.
<https://doi.org/10.1093/femsyr/fow105>.
- Cueva, Carolina, Irene Gil-Sánchez, Alba Tamargo, Beatriz Miralles, Julian Crespo, Begoña Bartolomé, et M. Victoria Moreno-Arribas. 2019. « Gastrointestinal Digestion of Food-Use Silver Nanoparticles in the Dynamic Simulator of the GastroIntestinal Tract (Simgi®). Impact on Human Gut Microbiota ». *Food and Chemical Toxicology* 132 (octobre): 110657. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110657>.
- Curtin, C., E. Kennedy, et P. A. Henschke. 2012a. « Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis* wine isolates ». *Letters in Applied Microbiology* 55 (1): 56-61. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03257.x>.
- Curtin, C., E. Kennedy, et P.a. Henschke. 2012b. « Genotype-Dependent Sulphite Tolerance of Australian *Dekkera* (*Brettanomyces*) *Bruxellensis* Wine Isolates ». *Letters in Applied Microbiology* 55 (1): 56-61. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03257.x>.
- Curtin, Chris D., Anthony R. Borneman, Paul J. Chambers, et Isak S. Pretorius. 2012. « De-Novo Assembly and Analysis of the Heterozygous Triploid Genome of the Wine Spoilage Yeast *Dekkera bruxellensis* AWRI1499 ». Édité par Cecile Fairhead. *PLoS ONE* 7 (3): e33840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033840>.
- Darriet, Philippe, et Alexandre Pons. 2017. « Wine ». In *Springer Handbook of Odor*, édité par Andrea Buettner, 25-26. Springer Handbooks. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26932-0_8.
- Darriet, Philippe, Takatoshi Tominaga, Valérie Lavigne, Jean-Noël Boidron, et Denis Dubourdieu. 1995. « Identification of a Powerful Aromatic Component of *Vitis Vinifera* L. Var. Sauvignon Wines: 4-Mercapto-4-Methylpentan-2-One ». *Flavour and Fragrance Journal* 10 (6): 385-92. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730100610>.
- Daudt, C. E., et C. S. Ough. 1980. « Action of Dimethyldicarbonate on Various Yeasts ». *American Journal of Enology and Viticulture* 31 (1): 21-23.
- Davaux, F., J.-B. Leroy, et L. Royant. 2019. « Stabilisation microbiologique des vins par utilisation de champs électriques pulsés ». Édité par P. Roca. *BIO Web of Conferences* 15: 02001. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191502001>.

- Davaux, François, C Houbart, et M Carrère. 2011. *Les UV-C : Une alternative a la stabilisation microbiologique des moûts et des vins*.
- Davis, Craig R., Djoko Wibowo, Graham H. Fleet, et Terry H. Lee. 1988. « Properties of Wine Lactic Acid Bacteria: Their Potential Enological Significance ». *American Journal of Enology and Viticulture* 39 (2): 137-42.
- Dean, W.R. 1927. « XVI. Note on the motion of fluid in a curved pipe ». *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 4 (20): 208-23. <https://doi.org/10.1080/14786440708564324>.
- Delsart, C., N. Grimi, N. Boussetta, C. Miot Sertier, R. Ghidossi, M. Mietton Peuchot, et E. Vorobiev. 2015. « Comparison of the Effect of Pulsed Electric Field or High Voltage Electrical Discharge for the Control of Sweet White Must Fermentation Process with the Conventional Addition of Sulfur Dioxide ». *Food Research International* 77 (novembre): 718-24. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.017>.
- Delsart, C., N. Grimi, N. Boussetta, C. Miot Sertier, R. Ghidossi, E. Vorobiev, et M. Mietton Peuchot. 2016. « Impact of Pulsed-Electric Field and High-Voltage Electrical Discharges on Red Wine Microbial Stabilization and Quality Characteristics ». *Journal of Applied Microbiology* 120 (1): 152-64. <https://doi.org/10.1111/jam.12981>.
- Demirdöven, Aslihan, et Taner Baysal. 2008. « The Use of Ultrasound and Combined Technologies in Food Preservation ». *Food Reviews International* 25 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1080/87559120802306157>.
- Diesler, Kathrin, Patricia Golombek, Lisa Kromm, Maren Scharfenberger-Schmeer, Dominik Durner, Hans Georg Schmarr, Mario R. Stahl, Karlis Briviba, et Ulrich Fischer. 2019a. « UV-C treatment of grape must: Microbial inactivation, toxicological considerations and influence on chemical and sensory properties of white wine ». *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 52 (December 2018): 291-304. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.01.005>.
- Diesler, Kathrin, Patricia Golombek, Lisa Kromm, Maren Scharfenberger-Schmeer, Dominik Durner, Hans-Georg Schmarr, Mario R. Stahl, Karlis Briviba, et Ulrich Fischer. 2019b. « UV-C Treatment of Grape Must: Microbial Inactivation, Toxicological Considerations and Influence on Chemical and Sensory Properties of White Wine ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 52 (mars): 291-304. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.01.005>.
- Divol, B., C. Miot-Sertier, et A. Lonvaud-Funel. 2006. « Genetic characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for “refermentation” in Botrytis-affected wines ». *Journal of Applied Microbiology* 100 (3): 516-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02818.x>.
- Drössler, P., W. Holzer, A. Penzkofer, et P. Hegemann. 2003. « Fluorescence Quenching of Riboflavin in Aqueous Solution by Methionin and Cystein ». *Chemical Physics* 286 (2): 409-20. [https://doi.org/10.1016/S0301-0104\(02\)00969-2](https://doi.org/10.1016/S0301-0104(02)00969-2).
- Drysdale, G. S., et G. H. Fleet. 1988. « Acetic Acid Bacteria in Winemaking: A Review ». *American Journal of Enology and Viticulture* 39 (2): 143-54.
- Du Toit, M., et I. S. Pretorius. 2000. « Microbial Spoilage and Preservation of Wine : Using Weapons for Nature’s Own Arsenal ». <https://doi.org/10.21548/21-1-3559>.
- Durner, Dominik, Kathrin Diesler, Patricia Golombek, Lisa Kromm, Mario Stahl, Karlis Briviba, Maren Scharfenberger-Schmeer, et Ulrich Fischer. 2017a. « Inactivation of microorganisms by UV-treatment of must and wine ». *BIO Web of Conferences* 9: 02001. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20170902001>.
- Eberlein, Chris, Omar Abou Saada, Anne Friedrich, Warren Albertin, et Joseph Schacherer. 2021. « Different trajectories of polyploidization shape the genomic landscape of the

- Brettanomyces bruxellensis yeast species ». *bioRxiv*, 2021.02.11.430840.
<https://doi.org/10.1101/2021.02.11.430840>.
- Edinger, W. D., et D. F. Splittstoesser. 1986. « Production by Lactic Acid Bacteria of Sorbic Alcohol, the Precursor of the Geranium Odor Compound ». *American Journal of Enology and Viticulture* 37 (1): 34-38.
- Edwards, C. G., K. M. Haag, et M. D. Collins. 1998. « Identification and Characterization of Two Lactic Acid Bacteria Associated With Sluggish/Stuck Fermentations ». *American Journal of Enology and Viticulture* 49 (4): 445-48.
- Edwards, C G, K M Haag, M D Collins, R A Hutson, et Y C Huang. 1998. « Lactobacillus Kunkeei Sp. Nov.: A Spoilage Organism Associated with Grape Juice Fermentations ». *Journal of Applied Microbiology* 84 (5): 698-702.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00399.x>.
- El Rayess, Y., C. Albasi, P. Bacchin, P. Taillandier, J. Raynal, M. Mietton-Peuchot, et A. Devatine. 2011. « Cross-Flow Microfiltration Applied to Oenology: A Review ». *Journal of Membrane Science* 382 (1-2): 1-19.
<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.08.008>.
- Elmnasser, N., S. Guillou, F. Leroi, N. Orange, A. Bakhrouf, et M. Federighi. 2007. « Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: A review ». *Canadian Journal of Microbiology* 53 (7): 813-21. <https://doi.org/10.1139/W07-042>.
- Engel, Karl Heinz, Robert A. Flath, Ron G. Buttery, Thomas R. Mon, David W. Ramming, et Roy Teranishi. 1988. « Investigation of Volatile Constituents in Nectarines. 1. Analytical and Sensory Characterization of Aroma Components in Some Nectarine Cultivars ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36 (3): 549-53.
<https://doi.org/10.1021/jf00081a036>.
- Enrique, M., A. Ibáñez, J.f. Marcos, M. Yuste, M. Martínez, S. Vallés, et P. Manzanares. 2010. « β -Glucanases as a Tool for the Control of Wine Spoilage Yeasts ». *Journal of Food Science* 75 (1): M41-45. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01448.x>.
- Enrique, María, Jose F. Marcos, María Yuste, Mireia Martínez, Salvador Vallés, et Paloma Manzanares. 2007. « Antimicrobial Action of Synthetic Peptides towards Wine Spoilage Yeasts ». *International Journal of Food Microbiology* 118 (3): 318-25.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.049>.
- . 2008. « Inhibition of the Wine Spoilage Yeast Dekkera Bruxellensis by Bovine Lactoferrin-Derived Peptides ». *International Journal of Food Microbiology* 127 (3): 229-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.011>.
- Escott, Carlos, L Carmen, Iris Loira, Carmen Gonz, Wendu Tesfaye, Antonio Su, et Antonio Morata. 2021. « Improvement of Must Fermentation from Late Harvest cv . Tempranillo Grapes Treated with Pulsed Light », 1-14.
- Escott, Carlos, Cristian Vaquero, Juan Manuel del Fresno, Maria Antonia Bañuelos, Iris Loira, Shun yu Han, Yang Bi, Antonio Morata, et Jose Antonio Suárez-Lepe. 2017. « Pulsed Light Effect in Red Grape Quality and Fermentation ». *Food and Bioprocess Technology* 10 (8): 1540-47. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1921-4>.
- F, Larue, Murakami Y, Boidron J.n, et Fohr L. 1986. « [First observations on the use of octanoic and decanoic acids as adjuvants to sulphur dioxide for the stabilization of sweet wines: organoleptic effects]. [French] ». *Connaissance de la Vigne et du Vin*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=%5Bfirst+observations+on+the+use+of+octanoic+and+decanoic+acids+as+adjuvants+to+sulphur+dioxide+for+the+stabilization+of+sweet+wines%3A+organoleptic+effects%5D.+%5Bfrench%5D&author=Larue+F.&publication_year=1986.

- Fan, Xuotong, et David J. Geveke. 2007. « Furan Formation in Sugar Solution and Apple Cider upon Ultraviolet Treatment ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (19): 7816-21. <https://doi.org/10.1021/jf071366z>.
- Fernández Zenoff, V., F. Siñeriz, et M. E. Farías. 2006. « Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments ». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (12): 7857-63. <https://doi.org/10.1128/AEM.01333-06>.
- Fernández-Mar, M.I., R. Mateos, M.C. García-Parrilla, B. Puertas, et E. Cantos-Villar. 2012. « Bioactive Compounds in Wine: Resveratrol, Hydroxytyrosol and Melatonin: A Review ». *Food Chemistry* 130 (4): 797-813. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.023>.
- Ferraretto, Paola, V. Cacciola, I. Batlló, et Emilio Celotti. 2013. « Ultrasounds application in winemaking: Grape maceration and yeast lysis ». *Italian Journal of Food Science* 25 (janvier): 160-68.
- Ferrario, Mariana, et Sandra Guerrero. 2017. « Impact of a combined processing technology involving ultrasound and pulsed light on structural and physiological changes of *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 in apple juice ». *Food Microbiology* 65: 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.012>.
- Ferreira, Delfim, Diana Moreira, Eduardo M. Costa, Sara Silva, M. Manuela Pintado, et José António Couto. 2013a. « The Antimicrobial Action of Chitosan Against the Wine Spoilage Yeast *Brettanomyces/Dekkera* ». *Journal of Chitin and Chitosan Science* 1 (3): 240-45. <https://doi.org/10.1166/jcc.2013.1037>.
- Ferreira, Delfim, Diana Moreira, Eduardo Costa, Sara Silva, Manuela Pintado, et José Couto. 2013b. « The Antimicrobial Action of Chitosan Against the Wine Spoilage Yeast *Brettanomyces/Dekkera* ». *Journal of Chitin and Chitosan Science* 1 (décembre): 240-45. <https://doi.org/10.1166/jcc.2013.1037>.
- Fleet, Graham. 1992. « Spoilage Yeasts ». *Critical Reviews in Biotechnology* 12 (1-2): 1-44. <https://doi.org/10.3109/07388559209069186>.
- Fleet, Graham H. 1993. *Wine Microbiology and Biotechnology*. CRC Press.
- Fleet, Graham H. 2007. « Yeasts in Foods and Beverages: Impact on Product Quality and Safety ». *Current Opinion in Biotechnology* 18 (2): 170-75. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.010>.
- Fleet, Graham H. 2008. « Wine yeasts for the future ». *FEMS Yeast Research* 8 (7): 979-95. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>.
- Flores, J. H., D. A. Heatherbell, et M. R. McDaniel. 1990. « Ultrafiltration of Wine: Effect of Ultrafiltration on White Riesling and Gewürztraminer Wine Composition and Stability ». *American Journal of Enology and Viticulture* 41 (3): 207-14.
- FORNEY, L. J., J. A. PIERSON, et Z. YE. 2004. « Juice Irradiation with Taylor-Couette Flow: UV Inactivation of *Escherichia coli* ». *Journal of Food Protection* 67 (11): 2410-15. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.11.2410>.
- Fracassetti, Daniela, Alessandra Di Canito, Rebecca Bodon, Natalia Messina, Ileana Vigentini, Roberto Foschino, et Antonio Tirelli. 2021. « Light-Struck Taste in White Wine: Reaction Mechanisms, Preventive Strategies and Future Perspectives to Preserve Wine Quality ». *Trends in Food Science & Technology* 112 (juin): 547-58. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.013>.
- Franz, Charles M. A. P., Ingrid Specht, Gyu-Sung Cho, Volker Graef, et Mario R. Stahl. 2009. « UV-C-Inactivation of Microorganisms in Naturally Cloudy Apple Juice Using Novel Inactivation Equipment Based on Dean Vortex Technology ». *Food Control* 20 (12): 1103-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.010>.

- Fredericks, Ilse N, Maret du Toit, et Maricel Krügel. 2011a. « Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines ». *Food Microbiology* 28 (3): 510-17. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.018>.
- Fredericks, Ilse N., Maret du Toit, et Maricel Krügel. 2011b. « Efficacy of Ultraviolet Radiation as an Alternative Technology to Inactivate Microorganisms in Grape Juices and Wines ». *Food Microbiology* 28 (3): 510-17. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.018>.
- Friedberg, Errol C., Alan R. Lehmann, et Robert P.P. Fuchs. 2005. « Trading Places: How do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? » *Molecular Cell* 18 (5): 499-505. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.032>.
- Friedberg, Errol C, Graham C Walker, Wolfram Siede, et Richard D Wood. 2005. *DNA repair and mutagenesis*. American Society for Microbiology Press.
- Fugelsang, Kenneth C. 2007. *Wine Microbiology*. Рипол Классик.
- Funes, Gustavo J., Paula L. Gómez, Silvia L. Resnik, et Stella M. Alzamora. 2013. « Application of Pulsed Light to Patulin Reduction in McIlvaine Buffer and Apple Products ». *Food Control* 30 (2): 405-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.001>.
- Gabriel, Alonzo A. 2012. « Inactivation of Escherichia coli O157:H7 and spoilage yeasts in germicidal UV-C-irradiated and heat-treated clear apple juice ». *Food Control* 25 (2): 425-32. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.011>.
- Gabriel, Alonzo A., et Hiroyuki Nakano. 2009. « Inactivation of Salmonella, E. coli and Listeria monocytogenes in phosphate-buffered saline and apple juice by ultraviolet and heat treatments ». *Food Control* 20 (4): 443-46. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.008>.
- Gao, Qunjie, et Ferran Garcia-Pichel. 2011. « Microbial ultraviolet sunscreens ». *Nature Reviews Microbiology* 9 (11): 791-802. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2649>.
- García-Ruiz, A., B. Bartolomé, A.J. Martínez-Rodríguez, E. Pueyo, P.J. Martín-Álvarez, et M.V. Moreno-Arribas. 2008. « Potential of Phenolic Compounds for Controlling Lactic Acid Bacteria Growth in Wine ». *Food Control* 19 (9): 835-41. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.08.018>.
- Garde-Cerdán, T., R. López, P. Garijo, L. González-Arenzana, A.r. Gutiérrez, I. López-Alfaro, et P. Santamaría. 2014. « Application of Colloidal Silver versus Sulfur Dioxide during Vinification and Storage of Tempranillo Red Wines ». *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20 (1): 51-61. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12050>.
- Gerbaux, V, Stéphanie Jeudy, et Christine Monamy. 2000. « Étude des phénols volatils dans les vins de Pinot noir en Bourgogne ». *Bulletin de l'OIV* 73 (835): 581-99.
- Goddard, Matthew R., et Duncan Greig. 2015. « Saccharomyces cerevisiae: A nomadic yeast with no niche? » *FEMS Yeast Research* 15 (3): 1-6. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov009>.
- Golombek, Patricia, Michael Wacker, Nina Buck, et Dominik Durner. 2021. « Impact of UV-C Treatment and Thermal Pasteurization of Grape Must on Sensory Characteristics and Volatiles of Must and Resulting Wines ». *Food Chemistry* 338 (février): 128003. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128003>.
- Gómez-López, Vicente M., Peter Ragaert, Johan Debevere, et Frank Devlieghere. 2007. « Pulsed light for food decontamination: a review ». *Trends in Food Science and Technology* 18 (9): 464-73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.03.010>.
- González-Arenzana, Lucía, Robert Sevenich, Cornelia Rauh, Rosa López, Dietrich Knorr, et Isabel López-Alfaro. 2016. « Inactivation of Brettanomyces Bruxellensis by High

- Hydrostatic Pressure Technology ». *Food Control* 59 (janvier): 188-95.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.038>.
- González-Centeno, María Reyes, Kleopatra Chira, et Pierre-Louis Teissedre. 2017.
 « Comparison between Malolactic Fermentation Container and Barrel Toasting Effects on Phenolic, Volatile, and Sensory Profiles of Red Wines ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (16): 3320-29. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05497>.
- González-Centeno, María Reyes, Michael Jourdes, Antoni Femenia, Susana Simal, Carmen Rosselló, et Pierre-Louis Teissedre. 2012. « Proanthocyanidin Composition and Antioxidant Potential of the Stem Winemaking Byproducts from 10 Different Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (48): 11850-58. <https://doi.org/10.1021/jf303047k>.
- Goodwin, Clariss O., et Justin R. Morris. 1991. « Effect of Ultrafiltration on Wine Quality and Browning ». *American Journal of Enology and Viticulture* 42 (4): 347-53.
- Gouma, Maria, Elisa Gayán, Javier Raso, Santiago Condón, et Ignacio Álvarez. 2015.
 « Inactivation of spoilage yeasts in apple juice by UV-C light and in combination with mild heat ». *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 32: 146-55.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.008>.
- Gounot, Jean-Sébastien, Cécile Neuvéglise, Kelle C Freel, Hugo Devillers, Jure Piškur, Anne Friedrich, et Joseph Schacherer. 2020. « High complexity and degree of genetic variation in *Brettanomyces bruxellensis* population ». Édité par Kenneth Wolfe. *Genome Biology and Evolution*, avril. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa077>.
- Gracin, Leo, Anet Režek Jambrak, Hrvoje Juretić, Slaven Dobrović, Irena Barukčić, Martin Grozdanović, et Goran Smoljanić. 2016. « Influence of High Power Ultrasound on *Brettanomyces* and Lactic Acid Bacteria in Wine in Continuous Flow Treatment ». *Applied Acoustics* 103 (février): 143-47.
<https://doi.org/10.1016/j.apacoust.2015.05.005>.
- Guerrero-Beltrán, Joséángel, Jorge Welti-Chanes, et Gustavo V. Barbosa-Cánovas. 2009.
 « Ultraviolet-C Light Processing of Grape, Cranberry and Grapefruit Juices to Inactivate *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Journal of Food Process Engineering* 32 (6): 916-32. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2008.00253.x>.
- Guilloux-Benatier, M, Y Le Fur, et M Feuillat. 1998. « Influence of Fatty Acids on the Growth of Wine Microorganisms *Saccharomyces Cerevisiae* and *Oenococcus Oeni* ». *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20 (3-4): 144-49.
<https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900502>.
- Guo, Yan-Yun, Yan-Ping Yang, Qian Peng, et Ye Han. 2015. « Biogenic Amines in Wine: A Review ». *International Journal of Food Science & Technology* 50 (7): 1523-32.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.12833>.
- Heard, G. M., et G. H. Fleet. 1987. « Occurrence and Growth of Killer Yeasts during Wine Fermentation ». *Applied and Environmental Microbiology* 53 (9): 2171-74.
<https://doi.org/10.1128/aem.53.9.2171-2174.1987>.
- Heresztyn, Tamila. 1986. « Formation of Substituted Tetrahydropyridines by Species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* Isolated from Mousy Wines ». *American Journal of Enology and Viticulture* 37 (2): 127-32.
- Hirst, Marissa B., et Chandra L. Richter. 2016. « Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in Beverage Fermentations ». *American Journal of Enology and Viticulture* 67 (4): 361-70.
<https://doi.org/10.5344/ajev.2016.15098>.
- Hoenicke, Katrin, Thomas J Simat, Hans Steinhart, Norbert Christoph, Martin Geßner, et Hans-Jürgen Köhler. 2002. « 'Untypical Aging off-Flavor' in Wine: Formation of 2-

- Aminoacetophenone and Evaluation of Its Influencing Factors ». *Analytica Chimica Acta* 458 (1): 29-37. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01523-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01523-9).
- Horlacher, Nora, et Wolfgang Schwack. 2014. « Photooxidation of Tryptophan Leading to 2-Aminoacetophenone – A Possible Reason for the Untypical Aging Off-Flavor in Wine ». *Photochemistry and Photobiology* 90 (6): 1257-63. <https://doi.org/10.1111/php.12321>.
- Hoydonckx, H. E., W. M. Van Rhijn, W. Van Rhijn, D. E. De Vos, et P. A. Jacobs. 2007. « Furfural and Derivatives ». In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. American Cancer Society. https://doi.org/10.1002/14356007.a12_119.pub2.
- Huang, Y.-C., C. G. Edwards, J. C. Peterson, et K. M. Haag. 1996. « Relationship Between Sluggish Fermentations and the Antagonism of Yeast by Lactic Acid Bacteria ». *American Journal of Enology and Viticulture* 47 (1): 1-10.
- Huvaere, Kevin, et Leif H Skibsted. 2015. « Flavonoids Protecting Food and Beverages against Light ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95 (1): 20-35. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6796>.
- Hwang, Hee Jeong, Chan Ick Cheigh, et Myong Soo Chung. 2015. « Relationship between optical properties of beverages and microbial inactivation by intense pulsed light ». *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 31: 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.06.009>.
- Ikehata, Hironobu, et Tetsuya Ono. 2011. « The mechanisms of UV mutagenesis ». *Journal of Radiation Research* 52 (2): 115-25. <https://doi.org/10.1269/jrr.10175>.
- Islam, M. Shajedul, A. Patras, B. Pokharel, M. J. Vergne, M. Sasges, A. Begum, Kanyasiri Rakariyatham, Che Pan, et H. Xiao. 2016. « Effect of UV Irradiation on the Nutritional Quality and Cytotoxicity of Apple Juice ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (41): 7812-22. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02491>.
- Izquierdo-Cañas, Pedro M., Esteban García-Romero, Belén Huertas-Nebreda, et Sergio Gómez-Alonso. 2012. « Colloidal Silver Complex as an Alternative to Sulphur Dioxide in Winemaking ». *Food Control* 23 (1): 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.014>.
- Jack, R W, J R Tagg, et B Ray. 1995. « Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria ». *MICROBIOL. REV.* 59: 30. <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200933063803234.pdf>.
- Jiranek, Vladimir, Paul Grbin, Andrew Yap, Mark Barnes, et Darren Bates. 2007. « High Power Ultrasonics as a Novel Tool Offering New Opportunities for Managing Wine Microbiology ». *Biotechnology Letters* 30 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9518-z>.
- John, Dalia, et Hosahalli S. Ramaswamy. 2018. « Pulsed light technology to enhance food safety and quality: a mini-review ». *Current Opinion in Food Science* 23: 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.06.004>.
- Jordão, António M., et Fernanda Cosme. 2018. *Grapes and Wines: Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization*. BoD – Books on Demand.
- Junqua, Remy. 2017. « Procédés innovants de stabilisation microbiologique des moûts et des vins ». These de doctorat, Bordeaux. <https://www.theses.fr/2017BORD0910>.
- Junqua, Rémy, Daniele Carullo, Giovanna Ferrari, Gianpiero Pataro, et Rémy Ghidossi. 2021. « Ohmic Heating for Polyphenol Extraction from Grape Berries: An Innovative Prefermentary Process ». *OENO One* 55 (3): 39-51. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.3.4647>.
- Junqua, Rémy, Emmanuel Vinsonneau, et Rémy Ghidossi. 2020. « Microbial stabilization of grape musts and wines using coiled UV-C reactor ». *Oeno One* 54 (1): 109-21. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2020.54.1.2944>.

- Keener, L, et K Krishnamurthy. 2014. « Shedding Light on Food Safety: Applications of Pulsed Light Processing ». *Food Safety Magazine*.
- Keyser, Maricel, Ilze A. Müller, Frans P. Cilliers, Wihann Nel, et Pieter A. Gouws. 2008. « Ultraviolet Radiation as a Non-Thermal Treatment for the Inactivation of Microorganisms in Fruit Juice ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9 (3): 348-54. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.09.002>.
- Kim, Do Kyun, Soo Ji Kim, et Dong Hyun Kang. 2017. « Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts ». *Food Research International* 97 (February): 280-87. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.009>.
- Knorr, Dietrich, Marco Zenker, Volker Heinz, et Dong-Un Lee. 2004. « Applications and Potential of Ultrasonics in Food Processing ». *Trends in Food Science & Technology* 15 (5): 261-66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.12.001>.
- Koutchma, Tatiana. 2009. « Advances in Ultraviolet Light Technology for Non-Thermal Processing of Liquid Foods ». *Food and Bioprocess Technology* 2 (2): 138-55. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0178-3>.
- Koutchma, Tatiana, Susanne Keller, Stuart Chirtel, et Brian Parisi. 2004. « Ultraviolet Disinfection of Juice Products in Laminar and Turbulent Flow Reactors ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5 (2): 179-89. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.01.004>.
- Koutchma, Tatiana, Brian Parisi, et Eduardo Patazca. 2007. « Validation of UV Coiled Tube Reactor for Fresh Juices ». *Journal of Environmental Engineering and Science* 6 (3): 319-28. <https://doi.org/10.1139/s06-058>.
- Kramer, B., J. Wunderlich, et P. Muranyi. 2017a. « Recent findings in pulsed light disinfection ». *Journal of Applied Microbiology* 122 (4): 830-56. <https://doi.org/10.1111/jam.13389>.
- Kramer, B., J. Wunderlich, et P. Muranyi. 2017b. « Impact of treatment parameters on pulsed light inactivation of microorganisms on a food simulant surface ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 42 (août): 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.05.011>.
- Krishnamurthy, Kathiravan, Jagdish C. Tewari, Joseph Irudayaraj, et Ali Demirci. 2008. « Microscopic and Spectroscopic Evaluation of Inactivation of Staphylococcus Aureus by Pulsed UV Light and Infrared Heating ». *Food and Bioprocess Technology* 3 (1): 93. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0084-8>.
- Kunkee, R., et L. Bisson. 1993. « Wine-making yeasts. » In . <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092543-1.50013-8>.
- Leeuwen, Cornelis van, et Philippe Darriet. 2016. « The Impact of Climate Change on Viticulture and Wine Quality ». *Journal of Wine Economics* 11 (1): 150-67. <https://doi.org/10.1017/jwe.2015.21>.
- Levy, Caroline, Xavier Aubert, Bernard Lacour, et Frédéric Carlin. 2012. « Relevant factors affecting microbial surface decontamination by pulsed light ». *International Journal of Food Microbiology* 152 (3): 168-74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.022>.
- Libkind, Diego, Martín Moliné, José Paulo Sampaio, et Maria Van Broock. 2009. « Yeasts from high-altitude lakes: Influence of UV radiation ». *FEMS Microbiology Ecology* 69 (3): 353-62. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00728.x>.
- Liburdi, K., I. Benucci, et M. Esti. 2014. « Lysozyme in Wine: An Overview of Current and Future Applications ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13 (5): 1062-73. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12102>.

- Lidzbarsky, Gabriel A, Tamar Shkolnik, et Eviatar Nevo. 2009. « Adaptive response to DNA-damaging agents in natural *Saccharomyces cerevisiae* populations from “Evolution Canyon”, Mt. Carmel, Israel ». *PLoS ONE* 4 (6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005914>.
- Ligrani, Phillip M. 1994. « A Study of Dean Vortex Development and Structure in a Curved Rectangular Channel with Aspect Ratio of 40 at Dean Numbers Up to 430 ». NAVAL POSTGRADUATE SCHOOL MONTEREY CA DEPT OF MECHANICAL ENGINEERING. <https://apps.dtic.mil/sti/citations/ADA286159>.
- Lipscomb, L. A., M. E. Peek, M. L. Morningstar, S. M. Verghis, E. M. Miller, A. Rich, J. M. Essigmann, et L. D. Williams. 1995. « X-Ray Structure of a DNA Decamer Containing 7,8-Dihydro-8-Oxoguanine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (3): 719-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.3.719>.
- Lisanti, Maria Tiziana, Giuseppe Blaiotta, Claudia Nioi, et Luigi Moio. 2019. « Alternative Methods to SO₂ for Microbiological Stabilization of Wine ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18 (2): 455-79. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12422>.
- Liu, S.-Q., et G.j. Pilone. 1998. « A REVIEW : Arginine Metabolism in Wine Lactic Acid Bacteria and Its Practical Significance ». *Journal of Applied Microbiology* 84 (3): 315-27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00350.x>.
- Liu, S.-Q., G. G. Pritchard, M. J. Hardman, et G. J. Pilone. 1994. « Citrulline Production and Ethyl Carbamate (Urethane) Precursor Formation From Arginine Degradation by Wine Lactic Acid Bacteria *Leuconostoc Oenos* and *Lactobacillus Buchneri* ». *American Journal of Enology and Viticulture* 45 (2): 235-42.
- Longan, Emery, Melissa Knutsen, James Shinkle, et Renee J Chosed. 2017. « Adapting a Photochemical Reactor to the Study of UV Ecology in Vineyard Yeast ». *American Journal of Enology and Viticulture* 68 (4): 499-503.
<https://doi.org/10.5344/ajev.2017.16110>.
- Lonvaud-Funel, Aline. 1999. « Lactic Acid Bacteria in the Quality Improvement and Depreciation of Wine ». In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, 19–23 September 1999, Veldhoven, The Netherlands*, édité par W. N. Konings, O. P. Kuipers, et J. H. J. Huis In 't Veld, 317-31. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4_16.
- Lonvaud-Funel, Aline, Y. Guilloux, et Annick Joyeux. 1993. « Isolation of a DNA Probe for Identification of Glucan-Producing *Pediococcus Damnosus* in Wines ». *Journal of Applied Bacteriology* 74 (1): 41-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02994.x>.
- Lonvaud-Funel, Aline, et Annick Joyeux. 1994. « Histamine Production by Wine Lactic Acid Bacteria: Isolation of a Histamine-Producing strain of *Leuconostoc Oenos* ». *Journal of Applied Bacteriology* 77 (4): 401-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb03441.x>.
- Lopez, Isabel, Pilar Santamaria, Carmen Tenorio, Patrocinio Garijo, Ana Rosa Gutierrez, et Rosa Lopez. 2009. « Evaluation of Lysozyme to Control Vinification Process and Histamine Production in Rioja Wines ». *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (9): 1005-12.
- Loureiro, V., et Manuel Malfeito-Ferreira. 2003. « Spoilage yeasts in the wine industry ». *International Journal of Food Microbiology* 86 (1-2): 23-50.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00246-0).

- Lucas-Lledó, José Ignacio, et Michael Lynch. 2009. « Evolution of mutation rates: Phylogenomic analysis of the photolyase/cryptochrome family ». *Molecular Biology and Evolution* 26 (5): 1143-53. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp029>.
- Lukić, Katarina, Mladen Brnčić, Natka Čurko, Marina Tomašević, Ana Jurinjak Tušek, et Karin Kovačević Ganić. 2020. « Quality Characteristics of White Wine: The Short- and Long-Term Impact of High Power Ultrasound Processing ». *Ultrasonics Sonochemistry* 68 (novembre): 105194. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105194>.
- Lukić, Katarina, Mladen Brnčić, Natka Čurko, Marina Tomašević, Davor Valinger, Gabriela I. Denoya, Francisco J. Barba, et Karin Kovačević Ganić. 2019. « Effects of High Power Ultrasound Treatments on the Phenolic, Chromatic and Aroma Composition of Young and Aged Red Wine ». *Ultrasonics Sonochemistry* 59 (décembre): 104725. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104725>.
- Luksiene, Z., V. Gudelis, I. Buchovec, et J. Raudeliuniene. 2007. « Advanced high-power pulsed light device to decontaminate food from pathogens: Effects on Salmonella typhimurium viability in vitro ». *Journal of Applied Microbiology* 103 (5): 1545-52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03403.x>.
- Luo, Hua, Frank Schmid, Paul R. Grbin, et Vladimir Jiranek. 2012. « Viability of Common Wine Spoilage Organisms after Exposure to High Power Ultrasonics ». *Ultrasonics Sonochemistry* 19 (3): 415-20. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.06.009>.
- M, Lorenzini, Fracchetti F, Bolla V, Elena Stefanelli, Franca Rossi, et Sandra Torriani. 2010. *Ultraviolet light (UV-C) irradiation as an alternative technology for the control of microorganisms in Grape juice and wine*.
- Macris, Basil J., et Pericles Markakis. 1974. « Transport and Toxicity of Sulphur Dioxide in Saccharomyces Cerevisiae Var Ellipsoideus ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 25 (1): 21-29. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740250104>.
- Maisonhaute, Emmanuel, F. Javier Del Campo, et Richard G Compton. 2002. « Microelectrode Study of Single Cavitation Bubbles Induced by 500 KHz Ultrasound ». *Ultrasonics Sonochemistry* 9 (5): 275-83. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(02\)00074-3](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(02)00074-3).
- Malfeito-Ferreira, Manuel. 2019. « Spoilage Yeasts in Red Wines ». *Red Wine Technology*, 219-35. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814399-5.00015-3>.
- Malletroit, Véronique, Jean-Xavier Guinard, Ralph E. Kunkee, et Michael J. Lewis. 1991. « EFFECT of PASTEURIZATION ON MICROBIOLOGICAL and SENSORY QUALITY of WHITE GRAPE JUICE and WINE ». *Journal of Food Processing and Preservation* 15 (1): 19-29. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1991.tb00151.x>.
- Mandal, Ronit, Xanyar Mohammadi, Artur Wiktor, Anika Singh, et Anubhav Pratap Singh. 2020. « Applications of Pulsed Light Decontamination Technology in Food Processing: An Overview ». *Applied Sciences* 10 (10): 3606. <https://doi.org/10.3390/app10103606>.
- Mandal, Ronit, Xanyar Mohammadi, Artur Wiktor, Anika Singh, et Anubhav Pratap Singh. 2020. « Applications of pulsed light decontamination technology in food processing: An overview ». *Applied Sciences (Switzerland)* 10 (10). <https://doi.org/10.3390/app10103606>.
- Mandal, Ronit, et Anubhav Pratap-Singh. 2021. « Characterization of Continuous-Flow Pulsed UV Light Reactors for Processing of Liquid Foods in Annular Tube and Coiled Tube Configurations Using Actinometry and Computational Fluid Dynamics ». *Journal of Food Engineering* 304 (septembre): 110590. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110590>.

- Marambio-Jones, Catalina, et Eric M. V. Hoek. 2010. « A Review of the Antibacterial Effects of Silver Nanomaterials and Potential Implications for Human Health and the Environment ». *Journal of Nanoparticle Research* 12 (5): 1531-51. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>.
- Maron, Dorothy M., et Bruce N. Ames. 1983. « Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test ». *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 113 (3): 173-215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9).
- Martineau, Brigitte, et T. Henick-Kling. 1995. « Performance and Diacetyl Production of Commercial Strains of Malolactic Bacteria in Wine ». *Journal of Applied Bacteriology* 78 (5): 526-36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03095.x>.
- Martínez, J. A., M. Melgosa, M. M. Pérez, E. Hita, et A. I. Negueruela. 2001. « Note. Visual and Instrumental Color Evaluation in Red Wines ». *Food Science and Technology International* 7 (5): 439-44. <https://doi.org/10.1106/VFAT-5REN-1WK2-5JGQ>.
- Marugg, J.D. 1991. « Bacteriocins, their role in developing natural products ». *Food Biotechnology* 5 (3): 305-12. <https://doi.org/10.1080/08905439109549812>.
- Masneuf-Pomarede, Isabelle, Elodie Juquin, Cécile Miot-Sertier, Philippe Renault, Yečhan Laizet, Franck Salin, Hervé Alexandre, et al. 2015. « The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments ». *FEMS Yeast Research* 15 (5): 1-11. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov045>.
- MAUJEAN, A, et N. SEGUIN. 1983. « Contribution à l'étude des goûts de lumière dans les vins de Champagne. 3 - Les réactions photochimiques responsables des goûts de lumière dans le vin de Champagne ». *Contribution à l'étude des goûts de lumière dans les vins de Champagne. 3 - Les réactions photochimiques responsables des goûts de lumière dans le vin de Champagne* 3 (4): 589-601.
- Mckenzie, Hugh A., et Frederick H. White. 1991. « Lysozyme and α -Lactalbumin: Structure, Function, and Interrelationships ». In *Advances in Protein Chemistry*, édité par C. B. Anfinsen, Frederic M. Richards, John T. Edsall, et David S. Eisenberg, 41:173-315. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60198-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60198-9).
- Mei, Qiming, et Volodymyr Dvornyk. 2015. « Evolutionary history of the photolyase/cryptochrome superfamily in eukaryotes ». *PLoS ONE* 10 (9): 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135940>.
- Mekoue Nguela, J., A. Vernhet, A. Julien-Ortiz, N. Siczkowski, et J.-R. Mouret. 2019. « Effect of Grape Must Polyphenols on Yeast Metabolism during Alcoholic Fermentation ». *Food Research International* 121 (juillet): 161-75. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.038>.
- Meng, Ziqiang, Guohua Qin, Bo Zhang, et Juli Bai. 2004. « DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice ». *Mutagenesis* 19 (6): 465-68. <https://doi.org/10.1093/mutage/geh058>.
- Mestres, M, O Busto, et J Guasch. 2000. « Analysis of Organic Sulfur Compounds in Wine Aroma ». *Journal of Chromatography A* 881 (1): 569-81. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00220-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00220-X).
- Min, D. B., et J. M. Boff. 2002. « Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1 (2): 58-72. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00007.x>.
- Mok, Chulkyoon, Ki-Tae Song, Young-Seo Park, Sangbin Lim, Roger Ruan, et Paul Chen. 2006. « High Hydrostatic Pressure Pasteurization of Red Wine ». *Journal of Food Science* 71 (8): M265-69. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00145.x>.

- Moll, R., D. Veyret, F. Charbit, et P. Moulin. 2007. « Dean Vortices Applied to Membrane Process: Part I. Experimental Approach ». *Journal of Membrane Science* 288 (1): 307-20. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.11.030>.
- Morales-de la Peña, M., J. Welte-Chanes, et O. Martín-Belloso. 2019. « Novel technologies to improve food safety and quality ». *Current Opinion in Food Science* 30 (décembre): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.10.009>.
- Moulin, P, P Manno, J. C Rouch, C Serra, M. J Clifton, et P Aptel. 1999. « Flux Improvement by Dean Vortices: Ultrafiltration of Colloidal Suspensions and Macromolecular Solutions ». *Journal of Membrane Science* 156 (1): 109-30. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(98\)00333-0](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(98)00333-0).
- Müller, Alexandra, Karlis Briviba, Volker Gräf, Ralf Greiner, Christian Herrmann, Thomas Kuballa, et Mario R. Stahl. 2013. « UV-C Treatment Using a Dean Vortex Technology — Impact on Apple Juice Enzymes and Toxicological Potential ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 20 (octobre): 238-43. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.010>.
- Müller, Alexandra, Marta Orłowska, Michael Knörr, Mario R Stahl, Ralf Greiner, et Tatiana Koutchma. 2017. « Actinometric and Bidosimetric Evaluation of UV-C Dose Delivery in Annular, Taylor–Coutte and Coiled Tube Continuous Systems ». *Food Science and Technology International* 23 (3): 222-34. <https://doi.org/10.1177/1082013216679010>.
- Müller, Alexandra, Mario R. Stahl, Volker Graef, Charles M.A.P. Franz, et Melanie Huch. 2011. « UV-C Treatment of Juices to Inactivate Microorganisms Using Dean Vortex Technology ». *Journal of Food Engineering* 107 (2): 268-75. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.026>.
- Müller, Alexandra, Mario R. Stahl, Ralf Greiner, et Clemens Posten. 2014. « Performance and Dose Validation of a Coiled Tube UV-C Reactor for Inactivation of Microorganisms in Absorbing Liquids ». *Journal of Food Engineering* 138 (octobre): 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.04.013>.
- Muñoz, Arantxa, Irene M. Caminiti, Izabela Palgan, Gianpiero Pataro, Francesco Noci, Desmond J. Morgan, Denis A. Cronin, Paul Whyte, Giovanna Ferrari, et James G. Lyng. 2012. « Effects on Escherichia Coli Inactivation and Quality Attributes in Apple Juice Treated by Combinations of Pulsed Light and Thermosonication ». *Food Research International* 45 (1): 299-305. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.020>.
- Murakami, Edgar G., Lauren Jackson, Kevin Madsen, et Brian Schickedanz. 2006. « Factors Affecting the Ultraviolet Inactivation of Escherichia Coli K12 in Apple Juice and a Model System* ». *Journal of Food Process Engineering* 29 (1): 53-71. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2006.00049.x>.
- Nadra, María C. Manca de, et Ana M. Strasser de Saad. 1995. « Polysaccharide Production by *Pediococcus Pentosaceus* from Wine ». *International Journal of Food Microbiology* 27 (2): 101-6. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00118-P](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00118-P).
- Nehme, Nancy, Florence Mathieu, et Patricia Taillandier. 2010. « Impact of the Co-Culture of *Saccharomyces Cerevisiae*–*Oenococcus Oeni* on Malolactic Fermentation and Partial Characterization of a Yeast-Derived Inhibitory Peptidic Fraction ». *Food Microbiology* 27 (1): 150-57. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.09.008>.
- NF EN ISO 4120 - Analyse sensorielle - Méthodologie - Essai triangulaire
- Nguyen, T. H., G. H. Fleet, et P. L. Rogers. 1998. « Composition of the Cell Walls of Several Yeast Species ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (2): 206-12. <https://doi.org/10.1007/s002530051278>.

- Nicorescu, I., B. Nguyen, M. Moreau-Ferret, A. Agoulon, S. Chevalier, et N. Orange. 2013. « Pulsed light inactivation of *Bacillus subtilis* vegetative cells in suspensions and spices ». *Food Control* 31 (1): 151-57. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.047>.
- Nielsen, Jan Clair, et Claus Prah. 1996. « Metabolism of citric acid by *Leuconostoc oenos* in direct inoculation. Effect on wine flavour ». In *Oenologie 95 : 5e. Symposium International d' Oenologie, 1996, ISBN 2-7430-0083-X, págs. 317-320, 317-20. Technique & Documentation*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=554479>.
- Nikolantonaki, Maria. 2010. « Incidence de l'oxydation des composés phénoliques sur la composante aromatique des vins blancs ». These de doctorat, Bordeaux 2. <https://www.theses.fr/2010BOR21770>.
- Nunes, Cláudia, Mickael C. Santos, Jorge A. Saraiva, Sílvia M. Rocha, et Manuel A. Coimbra. 2017. « Chapter Six - Influence of High Hydrostatic Pressure Technology on Wine Chemical and Sensorial Characteristics: Potentialities and Drawbacks ». In *Advances in Food and Nutrition Research*, édité par Fidel Toldrá, 82:205-35. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.01.003>.
- Nyangaresi, Paul Onkundi, Yi Qin, Guolong Chen, Baoping Zhang, Yinghua Lu, et Liang Shen. 2019. « Comparison of the Performance of Pulsed and Continuous UVC-LED Irradiation in the Inactivation of Bacteria ». *Water Research* 157 (juin): 218-27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.080>.
- Oelofse, A., I. S. Pretorius, et M. Du Toit. 2008. « Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking : A Synoptic Review ». <https://scholar.sun.ac.za:443/handle/10019.1/8437>.
- Oelofse, A, I S Pretorius, et M Toit. 2008. « Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review ». *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 29 (2): 128-44. <https://doi.org/www.sasev.org/>.
- Note de conjoncture vitivinicole mondiale - OIV - 2020
- Oms-Oliu, Gemma, Olga Martín-Belloso, et Robert Soliva-Fortuny. 2010. « Pulsed light treatments for food preservation. A review ». *Food and Bioprocess Technology* 3 (1): 13-23. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0147-x>.
- Oro, Lucia, Laura Canonico, Valentina Marinelli, Maurizio Ciani, et Francesca Comitini. 2019. « Occurrence of *Brettanomyces bruxellensis* on Grape Berries and in Related Winemaking Cellar ». *Frontiers in Microbiology* 10 (MAR): 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00415>.
- Padilla, Beatriz, José V. Gil, et Paloma Manzanares. 2016. « Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity ». *Frontiers in Microbiology* 7 (MAR): 1-20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>.
- Pala, Çiğdem Uysal, et Ayşegül Kirca Toklucu. 2013. « Microbial, physicochemical and sensory properties of UV-C processed orange juice and its microbial stability during refrigerated storage ». *LWT - Food Science and Technology* 50 (2): 426-31. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.001>.
- Pala, Çiğdem Uysal, et Ayşegül Kirca Toklucu. 2011. « Effect of UV-C Light on Anthocyanin Content and Other Quality Parameters of Pomegranate Juice ». *Journal of Food Composition and Analysis*, 6th International Congress on Pigments in Food—Chemical, Biological and Technological Aspects, 24 (6): 790-95. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.003>.
- Palgan, I., I. M. Caminiti, A. Muñoz, F. Noci, P. Whyte, D. J. Morgan, D. A. Cronin, et J. G. Lyng. 2011. « Effectiveness of High Intensity Light Pulses (HILP) Treatments for the

- Control of Escherichia Coli and Listeria Innocua in Apple Juice, Orange Juice and Milk ». *Food Microbiology* 28 (1): 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.023>.
- Papadopoulou, Chrissanthy, Kalliopi Soutli, et Ioannis G. Roussis. 2005. « Potential Antimicrobial Activity of Red and White Wine Phenolic Extracts against Strains of Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Candida Albicans ». *Food Technology and Biotechnology* 43 (1): 41-46.
- Pataro, G., A. Muñoz, I. Palgan, F. Noci, G. Ferrari, et J. G. Lyng. 2011. « Bacterial inactivation in fruit juices using a continuous flow Pulsed Light (PL) system ». *Food Research International* 44 (6): 1642-48. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.048>.
- Patrineli, A., M. N. Clifford, R. Walker, et C. Ioannides. 1996. « Mutagenicity of White Grape Juice in the Ames Test ». *Food and Chemical Toxicology* 34 (6): 559-62. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(96\)00015-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(96)00015-4).
- Paulin, Margot, Cécile Miot-Sertier, Lucie Dutilh, Clément Brasselet, Cédric Delattre, Guillaume Pierre, Pascal Dubessay, et al. 2020. « Brettanomyces bruxellensis Displays Variable Susceptibility to Chitosan Treatment in Wine ». *Frontiers in Microbiology* 11 (September): 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.571067>.
- Peña, Rubén, et María Angélica Ganga. 2019. « Novel Antimicrobial Peptides Produced by Candida Intermedia LAMAP1790 Active against the Wine-Spoilage Yeast Brettanomyces Bruxellensis ». *Antonie van Leeuwenhoek* 112 (2): 297-304. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1159-9>.
- Pérez-López, Antonio J., María I. Rodríguez-López, Francisco Burló, Ángel A. Carbonell-Barrachina, José A. Gabaldón, et Vicente M. Gómez-López. 2020. « Evaluation of Pulsed Light to Inactivate Brettanomyces Bruxellensis in White Wine and Assessment of Its Effects on Color and Aromatic Profile ». *Foods* 9 (12): 1903. <https://doi.org/10.3390/foods9121903>.
- Petrova, Biljana, Zachary M. Cartwright, et Charles G. Edwards. 2016a. « Effectiveness of chitosan preparations against *Brettanomyces bruxellensis* grown in culture media and red wines ». *OENO One* 50 (1): 49. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2016.50.1.54>.
- Pilard, Etienne, Jules Harrouard, Cécile Miot-Sertier, Philippe Marullo, Warren Albertin, et Rémy Ghidossi. 2021. « Wine yeast species show strong inter- and intra-specific variability in their sensitivity to ultraviolet radiation ». *Food Microbiology* 100 (June): 103864. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103864>.
- Pinto, L., F. Baruzzi, L. Cocolin, et M. Malfeito-Ferreira. 2020. « Emerging technologies to control Brettanomyces spp. in wine: Recent advances and future trends ». *Trends in Food Science & Technology* 99 (March): 88-100. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.013>.
- Poitou, Xavier. 2016. « Contribution à la connaissance aromatique des vins rouges : Approche sensorielle et moléculaire des nuances « végétales, vertes » en lien avec leur origine ». These de doctorat, Bordeaux. <https://www.theses.fr/2016BORD0407>.
- Porter, L. J., et C. S. Ough. 1982. « The Effects of Ethanol, Temperature, and Dimethyl Dicarboxylate on Viability of Saccharomyces Cerevisiae Montrachet No. 522 in Wine ». *American Journal of Enology and Viticulture* 33 (4): 222-25.
- Portugal, Cauré, Luís Pinto, Miguel Ribeiro, Carmen Tenorio, Gilberto Igrejas, et Fernanda Ruiz-Larrea. 2015. « Potential spoilage yeasts in winery environments: Characterization and proteomic analysis of Trigonopsis cantarellii ». *International Journal of Food Microbiology* 210: 113-20. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.005>.
- Povey, M. J. W., et T. J. Mason. 1998. *Ultrasound in Food Processing*. Springer Science & Business Media.

- Pretorius, I. S., T. J. van der Westhuizen, et O. P. H. Augustyn. 1999. « Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry. A Review ». *South African Journal of Enology and Viticulture* 20 (2): 61-70. <https://doi.org/10.21548/20-2-2234>.
- Pripis-Nicolau, L., G. de Revel, A. Bertrand, et A. Lonvaud-Funel. 2004. « Methionine Catabolism and Production of Volatile Sulphur Compounds by *Enococcus Œni* ». *Journal of Applied Microbiology* 96 (5): 1176-84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02257.x>.
- Proulx, J., M. Agustin, G. Sullivan, S. VanWees, J. Jian, S. T. Hilton, et C. I. Moraru. 2017. « Short communication: Influence of pulsed light treatment on the quality and sensory characteristics of Cheddar cheese ». *Journal of Dairy Science* 100 (2): 1004-8. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11579>.
- Pulschen, André A., Fabio Rodrigues, Rubens T.D. Duarte, Gabriel G Araujo, Iara F Santiago, Ivan G. Paulino-Lima, Carlos A. Rosa, Massuo J. Kato, Vivian H. Pellizari, et Douglas Galante. 2015. « UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology ». *MicrobiologyOpen* 4 (4): 574-88. <https://doi.org/10.1002/mbo3.262>.
- Raafat, Dina, et Hans-Georg Sahl. 2009. « Chitosan and Its Antimicrobial Potential – a Critical Literature Survey ». *Microbial Biotechnology* 2 (2): 186-201. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x>.
- Raposo, R., M.J. Ruiz-Moreno, T. Garde-Cerdán, B. Puertas, J.M. Moreno-Rojas, A. Gonzalo-Diago, R.F. Guerrero, V. Ortiz, et E. Cantos-Villar. 2016. « Effect of Hydroxytyrosol on Quality of Sulfur Dioxide-Free Red Wine ». *Food Chemistry* 192 (février): 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.085>.
- Raposo, Rafaela, María J. Ruiz-Moreno, Teresa Garde-Cerdán, Belén Puertas, José M. Moreno-Rojas, Pilar Zafrilla, Ana Gonzalo-Diago, Raul F. Guerrero, et Emma Cantos-Villar. 2016. « Replacement of Sulfur Dioxide by Hydroxytyrosol in White Wine: Influence on Both Quality Parameters and Sensory ». *LWT - Food Science and Technology* 65 (janvier): 214-21. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.005>.
- Ravanat, Jean-Luc, Thierry Douki, et Jean Cadet. 2001. « Direct and Indirect Effects of UV Radiation on DNA and Its Components ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Consequences of exposure to sunlight: elements to assess protection, 63 (1): 88-102. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00206-8).
- R. Cardoso, Daniel, Silvia H. Libardi, et Leif H. Skibsted. 2012. « Riboflavin as a Photosensitizer. Effects on Human Health and Food Quality ». *Food & Function* 3 (5): 487-502. <https://doi.org/10.1039/C2FO10246C>.
- « RÈGLEMENT DÉLÉGUÉ (UE) 2015/ 1576 DE LA COMMISSION - du 6 juillet 2015 - modifiant le règlement (CE) no 606/ 2009 en ce qui concerne certaines pratiques œnologiques et le règlement (CE) no 436/ 2009 en ce qui concerne l'inscription de ces pratiques dans les registres du secteur vitivinicole ». s. d., 4.
- « Règlement (CE) no 606/2009 de la Commission du 10 juillet 2009 fixant certaines modalités d'application du règlement (CE) no 479/2008 du Conseil en ce qui concerne les catégories de produits de la vigne, les pratiques œnologiques et les restrictions qui s'y appliquent ». s. d., 59.
- « Règlement d'exécution (UE) no 203/2012 de la Commission du 8 mars 2012 modifiant le règlement (CE) no 889/2008 portant modalités d'application du règlement (CE) no 834/2007 du Conseil en ce qui concerne le vin biologique ». s. d., 6.
- Reguant, C, A Bordons, et L Arola. 2000. « Influence of Phenolic Compounds on the Physiology of *Enococcus Œni* from Wine ». *Journal of Applied Microbiology*, 7.

- Renouf, Vincent. 2006. « Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : Interactions et équilibres – Relation avec la qualité du Vin ». Phd. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000340/>.
- Rensburg, Pierre, et Isak Pretorius. 2000. « Enzymes in winemaking: Harnessing natural catalysts for efficient biotransformations ». *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21 (janvier): 52-73.
- Ribéreau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean, et D. Dubourdieu. 2006. « Handbook of Enology ». *Handbook of Enology 2* (juin): 1-441. <https://doi.org/10.1002/0470010398>.
- Rice, Jane K., et Michael Ewell. 2001. « Examination of Peak Power Dependence in the UV Inactivation of Bacterial Spores ». *Applied and Environmental Microbiology* 67 (12): 5830-32. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5830-5832.2001>.
- Rizk, Ziad, Youssef El Rayess, Chantal Ghanem, Florence Mathieu, Patricia Taillandier, et Nancy Nehme. 2018. « Identification of Multiple-Derived Peptides Produced by *Saccharomyces Cerevisiae* Involved in Malolactic Fermentation Inhibition ». *FEMS Yeast Research* 18 (7). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy080>.
- Rojo-Bezares, Beatriz, Yolanda Sáenz, Myriam Zarazaga, Carmen Torres, et Fernanda Ruiz-Larrea. 2007. « Antimicrobial Activity of Nisin against *Oenococcus Oeni* and Other Wine Bacteria ». *International Journal of Food Microbiology* 116 (1): 32-36. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.020>.
- Romano, A., M.C. Perello, G. De Revel, et A. Lonvaud-Funel. 2008. « Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine ». *Journal of Applied Microbiology* 104 (6): 1577-85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03693.x>.
- Rose, Anthony H. 1993. « Sulphur dioxide and other preservatives ». *Journal of Wine Research* 4 (1): 43. <https://doi.org/10.1080/09571269308717947>.
- Roudil, Ludovic, Pasquale Russo, Carmen Berbegal, Warren Albertin, Giuseppe Spano, et Vittorio Capozzi. 2019. « Non-*Saccharomyces* Commercial Starter Cultures: Scientific Trends, Recent Patents and Innovation in the Wine Sector ». *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* 11 (1): 27-39. <https://doi.org/10.2174/2212798410666190131103713>.
- Rowan, N. J., S. J. MacGregor, J. G. Anderson, R. A. Fouracre, L. McIlvaney, et O. Farish. 1999. « Pulsed-Light Inactivation of Food-Related Microorganisms ». *Applied and Environmental Microbiology* 65 (3): 1312-15. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1312-1315.1999>.
- Ruiz-Moreno, Maria J., Rafaela Raposo, Jose M. Moreno-Rojas, Pilar Zafrilla, Jose M. Cayuela, Juana Mulero, Belen Puertas, et al. 2015. « Efficacy of Olive Oil Mill Extract in Replacing Sulfur Dioxide in Wine Model ». *LWT - Food Science and Technology* 61 (1): 117-23. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.024>.
- Salcedo, I., J. A. Andrade, J. M. Quiroga, et E. Nebot. 2007. « Photoreactivation and dark repair in UV-treated microorganisms: Effect of temperature ». *Applied and Environmental Microbiology* 73 (5): 1594-1600. <https://doi.org/10.1128/AEM.02145-06>.
- Santos, Mickael C., Cláudia Nunes, Andreia S. Ferreira, Michael Jourdes, Pierre-Louis Teissedre, Ana Rodrigues, Osvaldo Amado, Jorge A. Saraiva, et Manuel A. Coimbra. 2019. « Comparison of High Pressure Treatment with Conventional Red Wine Aging Processes: Impact on Phenolic Composition ». *Food Research International* 116 (février): 223-31. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.018>.
- Santos, Mickael C., Cláudia Nunes, Michael Jourdes, Pierre-Louis Teissedre, Ana Rodrigues, Osvaldo Amado, Jorge A. Saraiva, et Manuel A. Coimbra. 2016. « Evaluation of the Potential of High Pressure Technology as an Enological Practice for Red Wines ».

- Innovative Food Science & Emerging Technologies* 33 (février): 76-83.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.11.018>.
- Santos, Mickael C., Cláudia Nunes, M. Angélica M. Rocha, Ana Rodrigues, Sílvia M. Rocha, Jorge A. Saraiva, et Manuel A. Coimbra. 2013. « Impact of High Pressure Treatments on the Physicochemical Properties of a Sulphur Dioxide-Free White Wine during Bottle Storage: Evidence for Maillard Reaction Acceleration ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 20 (octobre): 51-58.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.001>.
- . 2015. « High Pressure Treatments Accelerate Changes in Volatile Composition of Sulphur Dioxide-Free Wine during Bottle Storage ». *Food Chemistry* 188 (décembre): 406-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.002>.
- Santos, Mickael C., Cláudia Nunes, Jorge A. Saraiva, et Manuel A. Coimbra. 2012. « Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: Review of their potentialities and limitations ». *European Food Research and Technology* 234 (1): 1-12.
<https://doi.org/10.1007/s00217-011-1614-6>.
- Sarrazin, Elise, Denis Dubourdieu, et Philippe Darriet. 2007b. « Characterization of Key-Aroma Compounds of Botrytized Wines, Influence of Grape Botrytization ». *Food Chemistry* 103 (2): 536-45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.026>.
- . 2007a. « Characterization of Key-Aroma Compounds of Botrytized Wines, Influence of Grape Botrytization ». *Food Chemistry* 103 (2): 536-45.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.026>.
- Sasaki, T. 1992. « Induction of ploidy level increments in an asporogenous industrial strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by UV irradiation ». *Applied and Environmental Microbiology* 58 (3): 948-52. <https://doi.org/10.1128/aem.58.3.948-952.1992>.
- Schneider, Volker. 2014. « Atypical Aging Defect: Sensory Discrimination, Viticultural Causes, and Enological Consequences. A Review ». *American Journal of Enology and Viticulture* 65 (3): 277-84. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14014>.
- Schopp, Lauren M., Jungmin Lee, James P. Osborne, Stuart C. Chescheir, et Charles G. Edwards. 2013. « Metabolism of Nonesterified and Esterified Hydroxycinnamic Acids in Red Wines by *Brettanomyces bruxellensis* ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (47): 11610-17. <https://doi.org/10.1021/jf403440k>.
- Serra Colomer, Marc, Anna Chailyan, Ross T Fennessy, Kim Friis Olsson, Lea Johnsen, Natalia Solodovnikova, et Jochen Forster. 2020. « Assessing Population Diversity of *Brettanomyces* Yeast Species and Identification of Strains for Brewing Applications ». *Frontiers in Microbiology* 11 (April): 1-21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00637>.
- Silva, Vanessa, Gilberto Igrejas, Virgílio Falco, Teresa P. Santos, Carmen Torres, Ana M.P. Oliveira, José Eduardo Pereira, Joana S. Amaral, et Patrícia Poeta. 2018. « Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Phenolic Compounds Extracted from Wine Industry by-Products ». *Food Control* 92 (octobre): 516-22.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.031>.
- Singaravelan, Natarajan, Isabella Grishkan, Alex Beharav, Kazumasa Wakamatsu, Shosuke Ito, et Eviatar Nevo. 2008. « Adaptive melanin response of the soil fungus *Aspergillus niger* to UV radiation stress at “Evolution Canyon”, Mount Carmel, Israel ». *PLoS ONE* 3 (8): 2-6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002993>.
- Sinha, Rajeshwar P., et Donat-P. Häder. 2002. « UV-induced DNA damage and repair: a review ». *Photochemical & Photobiological Sciences* 1 (4): 225-36.
<https://doi.org/10.1039/b201230h>.

- Sipiczki, Matthias. 2016. « Overwintering of Vineyard Yeasts: Survival of Interacting Yeast Communities in Grapes Mummified on Vines ». *Frontiers in Microbiology* 7 (FEB): 1-17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00212>.
- Snowdon, Eleanor M., Michael C. Bowyer, Paul R. Grbin, et Paul K. Bowyer. 2006. « Mousy Off-Flavor: A Review ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (18): 6465-74. <https://doi.org/10.1021/jf0528613>.
- Soles, R. M., C. S. Ough, et R. E. Kunkee. 1982. « Ester Concentration Differences in Wine Fermented by Various Species and Strains of Yeasts ». *American Journal of Enology and Viticulture* 33 (2): 94-98.
- Souza, Poliana Mendes de, Alexandra Müller, Avelina Fernández, et Mario Stahl. 2014. « Microbiological Efficacy in Liquid Egg Products of a UV-C Treatment in a Coiled Reactor ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 21 (janvier): 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.10.017>.
- Stamatopoulos, Panagiotis. 2013. « caractérisation des composés impliqués par des phénomènes d'interactions perceptives dans les nuances fruitées de l'arôme des vins liquoreux ». These de doctorat, Bordeaux 2. <http://www.theses.fr/2013BOR22132>.
- Struyfs, Caroline, Bruno P. A. Cammue, et Karin Thevissen. 2021. « Membrane-Interacting Antifungal Peptides ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9: 706. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.649875>.
- Synthese bibliographique filtration des vins - MatéVi 2021 https://www.matevi-france.com/uploads/tx_matevibase/synthese_bibliographique_filtration_des_vins.pdf.
- Taillandier, P., C. Joannis-Cassan, J.-B. Jentzer, S. Gautier, N. Sieczkowski, D. Granes, et C. Brandam. 2015. « Effect of a Fungal Chitosan Preparation on *Brettanomyces Bruxellensis*, a Wine Contaminant ». *Journal of Applied Microbiology* 118 (1): 123-31. <https://doi.org/10.1111/jam.12682>.
- Takeshita, K., H. Yamanaka, T. Sameshima, S. Fukunaga, S. Isobe, K. Arihara, et M. Itoh. 2002. « Sterilization effect of pulsed light on various microorganisms ». *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents, Japan (Japan)*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=sterilization+effect+of+pulsed+light+on+various+microorganisms&author=Takeshita%2C+K.+%28Prima+Meat+Packers+Ltd.%2C+Tsuchiura%2C+Ibaraki+%28Japan%29.+Department+of+Basic+Research%29&publication_year=2002.
- Takeshita, Kazuko, Junko Shibato, Takashi Sameshima, Sakae Fukunaga, Seiichiro Isobe, Keizo Arihara, et Makoto Itoh. 2003. « Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation ». *International Journal of Food Microbiology* 85 (1-2): 151-58. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00509-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00509-3).
- Terrell, F. Renee, J.r. Morris, M.g. Johnson, E.e. Gbur, et D.j. Makus. 1993. « Yeast Inhibition in Grape Juice Containing Sulfur Dioxide, Sorbic Acid, and Dimethyldicarbonate ». *Journal of Food Science* 58 (5): 1132-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06131.x>.
- Tiwari, B. K., A. Patras, N. Brunton, P. J. Cullen, et C. P. O'Donnell. 2010. « Effect of Ultrasound Processing on Anthocyanins and Color of Red Grape Juice ». *Ultrasonics Sonochemistry* 17 (3): 598-604. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.10.009>.
- Toepfl, Stefan, Volker Heinz, et Dietrich Knorr. 2006. « Applications of Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry ». In *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry: Fundamentals and Applications*, édité par Javier Raso et Volker Heinz, 197-221. Food Engineering Series. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-31122-7_7.

- Tran, Mai Thu Thi, et Mohammed Farid. 2004. « Ultraviolet treatment of orange juice ». *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5 (4): 495-502. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.08.002>.
- Tristezza, Mariana, Cosimo Vetrano, Gianluca Bleve, Giuseppe Spano, Vittorio Capozzi, Antonio Logrieco, Giovanni Mita, et Francesco Grieco. 2013. « Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy ». *Food Microbiology* 36 (2): 335-42. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.001>.
- Tsukamoto, I., B. Yim, C. E. Stavarache, M. Furuta, K. Hashiba, et Y. Maeda. 2004. « Inactivation of *Saccharomyces Cerevisiae* by Ultrasonic Irradiation ». *Ultrasonics Sonochemistry* 11 (2): 61-65. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(03\)00135-4](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(03)00135-4).
- Tubia, Imanol, Karthik Prasad, Eva Pérez-Lorenzo, Cristina Abadín, Miren Zumárraga, Iñigo Oyanguren, Francisca Barbero, Jacobo Paredes, et Sergio Arana. 2018. « Beverage spoilage yeast detection methods and control technologies: A review of *Brettanomyces* ». *International Journal of Food Microbiology* 283 (March): 65-76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.020>.
- T. Wondrak, Georg, Myron K. Jacobson, et Elaine L. Jacobson. 2006. « Endogenous UVA-Photosensitizers: Mediators of Skin Photodamage and Novel Targets for Skin Photoprotection ». *Photochemical & Photobiological Sciences* 5 (2): 215-37. <https://doi.org/10.1039/B504573H>.
- Unluturk, S. Kucuk, H. Arastoopour, et T. Koutchma. 2004. « Modeling of UV Dose Distribution in a Thin-Film UV Reactor for Processing of Apple Cider ». *Journal of Food Engineering* 65 (1): 125-36. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.01.005>.
- Valérie, LEMPEREUR, et BLATEYRON Lucile. 2002. « Groupe national de travail sur les tanins œnologiques : premiers résultats. », 7.
- Valero, A., M. Begum, S. L. Leong, A. D. Hocking, A. J. Ramos, V. Sanchis, et S. Marín. 2007. « Effect of germicidal UVC light on fungi isolated from grapes and raisins ». *Letters in Applied Microbiology* 45 (3): 238-43. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02175.x>.
- Vally, H., N. L. A. Misso, et V. Madan. 2009. « Clinical Effects of Sulphite Additives ». *Clinical & Experimental Allergy* 39 (11): 1643-51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x>.
- Vally, Hassan, et Philip Thompson. 2003. « Allergic and Asthmatic Reactions to Alcoholic Drinks ». *Addiction Biology* 8 (1): 3-11. <https://doi.org/10.1080/1355621031000069828>.
- Van Rensburg, P., et I. S. Pretorius. 2000. « Enzymes in Winemaking: Harnessing Natural Catalysts for Efficient Biotransformations - A Review ». *South African Journal of Enology and Viticulture (South Africa)*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Enzymes+in+winemaking%3A+Harnessing+natural+catalysts+for+efficient+biotransformations+-+A+review&author=Van+Rensburg%2C+P.+%28Stellenbosch+Univ.%2C+Matieland+%28South+Africa%29.+Inst.+for+Wine+Biotechnology%29&publication_year=2000.
- Varela, C, C. Bartel, M Roach, A. Borneman, et C. Curtin. 2019. « *Brettanomyces bruxellensis* SSU1 Haplotypes Confer Different Levels of Sulfite Tolerance When Expressed in a *Saccharomyces cerevisiae* SSU1 Null Mutant ». Édité par M. Julia Pettinari. *Applied and Environmental Microbiology* 85 (4): 1-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02429-18>.
- Varela, Cristian, et Anthony R. Borneman. 2017. « Yeasts found in vineyards and wineries ». *Yeast* 34 (3): 111-28. <https://doi.org/10.1002/yea.3219>.

- Vilela, Alice. 2018. *Generation of Aromas and Flavours*. BoD – Books on Demand.
- Villettaz, J.-C., D. Steiner, et H. Trogus. 1984. « The Use of a Beta Glucanase as an Enzyme in Wine Clarification and Filtration ». *American Journal of Enology and Viticulture* 35 (4): 253-56.
- Vollmer, Kathrin, Snehasis Chakraborty, Prasanna Prakash Bhalerao, Reinhold Carle, Jan Frank, et Christof Björn Steingass. 2020. « Effect of Pulsed Light Treatment on Natural Microbiota, Enzyme Activity, and Phytochemical Composition of Pineapple (*Ananas Comosus* [L.] Merr.) Juice ». *Food and Bioprocess Technology* 13 (7): 1095-1109. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02460-7>.
- Vuuren, H. J. J. Van, et C. J. Jacobs. 1992. « Killer Yeasts in the Wine Industry: A Review ». *American Journal of Enology and Viticulture* 43 (2): 119-28.
- Wang, Chunxiao, David García-Fernández, Albert Mas, et Braulio Esteve-Zarzoso. 2015. « Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE ». *Frontiers in Microbiology* 6 (OCT): 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01156>.
- Wang, Y, et A Casadevall. 1994. « Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. » *Applied and Environmental Microbiology* 60 (10): 3864-66. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.10.3864-3866.1994>.
- Waterhouse, Andrew L. 2002. « Wine Phenolics ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 957 (1): 21-36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x>.
- Waterhouse, Andrew L., Gavin L. Sacks, et David W. Jeffery. 2016. *Understanding Wine Chemistry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118730720>.
- Wekhof, Alexander. s. d. « Disinfection with Flash Lamps », 13.
- Wilker, Karl L., et Murli R. Dharmadhikari. 1997. « Treatment of Barrel Wood Infected with Acetic Acid Bacteria ». *American Journal of Enology and Viticulture* 48 (4): 516-20.
- Wilkinson, L.J., R.J. White, et J.K. Chipman. 2011. « Silver and Nanoparticles of Silver in Wound Dressings: A Review of Efficacy and Safety ». *Journal of Wound Care* 20 (11): 543-49. <https://doi.org/10.12968/jowc.2011.20.11.543>.
- Windholtz, Sara, Pascaline Redon, Soizic Lacampagne, Laura Farris, Georgia Lytra, Margaux Cameleyre, Jean Christophe Barbe, Joana Coulon, Joana Thibon, et Isabelle Masneuf-Pomarède. 2021. « Non-Saccharomyces yeasts as bioprotection in the composition of red wine and in the reduction of sulfur dioxide ». *Lwt* 149. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111781>.
- Xu, Feifei, Bei Wang, Chen Hong, Shabuerbieke Telebielaigen, John Nsor-Atindana, Yuqing Duan, et Fang Zhong. 2019. « Optimization of spiral continuous flow-through pulse light sterilization for *Escherichia coli* in red grape juice by response surface methodology ». *Food Control* 105 (December 2018): 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.023>.
- Yang, Nannan, Kang Huang, Chenang Lyu, et Jianping Wang. 2016. « Pulsed Electric Field Technology in the Manufacturing Processes of Wine, Beer, and Rice Wine: A Review ». *Food Control* 61 (mars): 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.022>.
- Yildiz, H., H. Bozkurt, et F. Icier. 2009. « Ohmic and Conventional Heating of Pomegranate Juice: Effects on Rheology, Color, and Total Phenolics ». *Food Science and Technology International* 15 (5): 503-12. <https://doi.org/10.1177/1082013209350352>.
- Yu, Shirong, Yumin Teng, Raymond Waters, et Simon H. Reed. 2011. « How chromatin is remodelled during DNA repair of UV-Induced DNA damage in *saccharomyces cerevisiae* ». *PLoS Genetics* 7 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002124>.

- Zhang, Meng, Lijuan Wang, et Dongping Zhong. 2017. « Photolyase: Dynamics and Mechanisms of Repair of Sun-Induced DNA Damage ». *Photochemistry and Photobiology* 93 (1): 78-92. <https://doi.org/10.1111/php.12695>.
- Zhang, Qing-An, Yuan Shen, Xue-Hui Fan, et Juan Francisco García Martín. 2016. « Preliminary Study of the Effect of Ultrasound on Physicochemical Properties of Red Wine ». *CyTA - Journal of Food* 14 (1): 55-64. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1045036>.
- Zoecklein, Bruce, Kenneth C. Fugelsang, Barry H. Gump, et Fred S. Nury. 2013. *Wine Analysis and Production*. Springer Science & Business Media.
- Zott, Katharina, Cecile Miot-Sertier, Olivier Claisse, Aline Lonvaud-Funel, et Isabelle Masneuf-Pomarede. 2008. « Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking ». *International Journal of Food Microbiology* 125 (2): 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.001>.
- Zuehlke, J. M., B. Petrova, et C. G. Edwards. 2013. « Advances in the control of wine spoilage by Zygosaccharomyces and Dekkera/Brettanomyces ». *Annual Review of Food Science and Technology* 4 (1): 57-78. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182533>.