




OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25496

To cite this version:

Marchandise, Chloé . *Impact de l'ajout de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières sur la flore des laits crus*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 133 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

IMPACT DE L'AJOUT DE LEVURES VIVANTES DANS L'ALIMENTATION DES VACHES LAITIÈRES SUR LA FLORE DES LAITS CRUS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

MARCHANDISE Chloé
Née, le 03/05/1992 à LE PUY-EN-VELAY (43)

Directeur de thèse : M. Francis ENJALBERT

JURY

PRESIDENT :

Mme Florence TREMOLLIÈRES

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Francis ENJALBERT

M. Xavier BERTHELOT

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*

- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

- Mme **BORDE DORE Laura**, *Médecine interne des équidés*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Florence TREMOLLIÈRES

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

Maitre de conférences des Universités

Praticien Hospitalier

Endocrinologie et métabolismes

Qui nous a fait l'honneur de présider ce jury de thèse,
Veuillez accepter mes hommages respectueux

A Monsieur le Professeur Francis ENJALBERT

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Alimentation – Nutrition

Qui m'a guidé dans la réalisation de ce travail de rédaction,
Pour sa patience et sa disponibilité,
Sincères remerciements

A Monsieur le Professeur Xavier BERTHELOT

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Pathologie de la reproduction

Qui me fait l'honneur de participer à ce jury de thèse,
Veuillez accepter mes plus sincères remerciements

Au CERAQ, Centre de Ressources pour l'Agriculture de Qualité et de montagne, pour avoir mis en place un si beau projet. Mes sincères remerciements.

Et à Philéo Lesaffre, merci pour leur aide et leur participation.

Au Docteur Philippe POTTIE,

Vétérinaire praticien en médecine bovine à Valleiry, pour ton soutien et ton aide,

Mes sincères remerciements

| | |
|--|-----------|
| REMERCIEMENTS | 1 |
| Table des annexes | 5 |
| Table des illustrations | 6 |
| Table des figures..... | 6 |
| Table des graphiques | 8 |
| Table des tableaux | 10 |
| Table des photographies..... | 11 |
| ABREVIATIONS..... | 12 |
| INTRODUCTION..... | 13 |
| 1 LES FLORES DES LAITS CRUS : ETAT DES LIEUX (ORIGINE, INTERET ET DEVENIR)..... | 21 |
| 1.1 Caractérisation et rôle de la flore des laits crus..... | 22 |
| 1.1.1 Flores d'intérêt fromagères | 23 |
| 1.1.1.1 Les bactéries..... | 23 |
| 1.1.1.2 Les levures et champignons..... | 24 |
| 1.1.2 Micro-organismes responsables d'altérations | 25 |
| 1.1.2.1 Les bactéries..... | 25 |
| 1.1.2.2 Les levures-moisissures | 25 |
| 1.2 Facteurs affectant le développement des germes dans le lait..... | 25 |
| 1.2.1 Facteurs intrinsèques..... | 26 |
| 1.2.1.1 L'activité de l'eau (aw) | 26 |
| 1.2.1.2 Le potentiel d'oxydoréduction..... | 26 |
| 1.2.1.3 Composition en nutriments..... | 27 |
| 1.2.2 Facteur extrinsèque | 27 |
| 1.3 Influence des pratiques d'élevages sur les réservoirs de flore des laits et sur la microflore des laits crus..... | 28 |
| 1.3.1 Principaux réservoirs de la flore des laits cru et flux microbiens..... | 29 |
| 1.3.1.1 Contexte..... | 29 |
| 1.3.1.2 Les principaux réservoirs de flore et les flux entre eux | 30 |
| 1.3.2 Focus sur l'influence des pratiques d'élevages | 32 |
| 2 L'AJOUT DE LEVURES VIVANTES : OBJECTIF D'UTILISATION, MECANISMES D'ACTION DANS LE RUMEN | 36 |
| 2.1 Pourquoi utiliser des levures vivantes ?..... | 37 |
| 2.2 Quels sont les mécanismes sous-jacents ?..... | 39 |
| 2.2.1 Microflore du rumen, mécanisme d'acidose et utilisation de levures vivantes | 39 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.2 | Hypothèse du maintien du pH ruminal, l'action des levures vivantes sur la multiplication microbienne..... | 43 |
| 3 | Problématique de l'étude | 46 |
| 4 | Hypothèses de recherche et objectifs..... | 47 |
| 5 | STRATEGIE ET MOYENS MIS EN OEUVRE..... | 49 |
| 5.1 | Dispositif expérimental et choix des supports de prélèvement..... | 49 |
| 5.2 | Echantillonnage..... | 50 |
| 5.2.1 | Le support trayon..... | 51 |
| 5.2.2 | Le support air..... | 52 |
| 5.2.3 | Le support bouse..... | 53 |
| 5.2.4 | Le support lait de mélange..... | 53 |
| 6 | ANALYSES ET DONNÉES DISPONIBLES | 55 |
| 6.1 | Préparation des échantillons..... | 55 |
| 6.2 | Analyses microbiologiques | 55 |
| 6.3 | Envoi des géloses à Philéo Lesaffre | 56 |
| 6.4 | Extraction d'ADN pour métagénomique | 56 |
| 6.5 | Traitement bioinformatique des données de métagénomique | 56 |
| 7 | RESULTATS DE L'ÉTUDE..... | 59 |
| 7.1 | Retrouve-t-on des levures vivantes Sc47 ? Sur quel(s) support(s) ?..... | 59 |
| 7.1.1 | Résultats des dénombrements..... | 59 |
| 7.1.1.1 | Germes totaux..... | 59 |
| 7.1.1.2 | Moisissures | 60 |
| 7.1.1.3 | Levures..... | 61 |
| 7.1.1.4 | Saccharomyces cerevisiae (SC) | 62 |
| 7.1.2 | L'apport du métabarcoding sur la présence ou non de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 66 |
| 7.1.2.1 | Pour l'air | 66 |
| 7.1.2.2 | Pour la bouse..... | 67 |
| 7.1.2.3 | Pour les trayons | 68 |
| 7.1.2.4 | Pour le lait..... | 69 |
| 7.1.2.5 | Un exemple particulier..... | 70 |
| 7.1.3 | Résultats d'identification de la souche Sc47 selon les supports..... | 72 |
| 7.2 | Comment réagit l'écosystème des différents supports étudiés à l'ajout de levures vivantes Sc47 dans l'alimentation des vaches laitières ?..... | 76 |
| 7.2.1 | Observations générales | 77 |
| 7.2.1.1 | Les bactéries..... | 77 |
| 7.2.1.2 | Les champignons | 81 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 7.2.2 | Diversité Alpha | 85 |
| 7.2.2.1 | Bactéries..... | 86 |
| 7.2.2.2 | Fungi | 87 |
| 7.2.3 | LDA – Linear Discriminant Analysis | 89 |
| 7.2.4 | Diversité Beta..... | 93 |
| 7.2.4.1 | Analyse multi-variée..... | 93 |
| 8 | DISCUSSION | 97 |
| 8.1 | Complémentarité des différentes approches..... | 97 |
| 8.2 | Complémentarité des différentes analyses et effet de la distribution des levures vivantes Actisaf® Sc47 sur la dynamique des écosystèmes du lait cru et de ses réservoirs | 98 |
| 8.3 | La levure vivante se disperse-t-elle dans les réservoirs des laits crus à partir de l'alimentation des vaches laitières ? | 101 |
| 8.4 | Perspective en terme de poursuite de l'étude de l'impact des levures vivantes sur l'écosystème | 102 |
| 8.5 | Perspective quant à la poursuite de l'analyse de la banque de données créés pendant l'étude..... | 103 |
| | CONCLUSION..... | 107 |
| | BIBLIOGRAPHIE | 110 |

Table des annexes

| | |
|--|-----|
| <u>ANNEXE 1 : Cahier des Charges et Levures Vivantes</u> | 119 |
| <u>ANNEXE 2 : Complément d'information concernant les éleveurs sélectionnés et leurs pratiques</u> | 121 |
| <u>ANNEXE 3 : Représentation NMDS et PERMANOVA associées, pour la population bactérienne</u> | 126 |
| <u>ANNEXE 5 : Représentation NMDS et PERMANOVA associées, pour la population fongique</u> | 130 |

Table des illustrations

Table des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Localisation géographique des Savoie (wikipedia)..... | 14 |
| Figure 2 Répartition géographique des AOP et IGP en Savoie et Haute-Savoie (d'après Penelope, stagiaire ceraq 2018)..... | 14 |
| Figure 3 : Composition du lait. ESD : extrait sec Dégraissé, EST : Extrait Sec Total, MG : Matière Grasse (Cours HIDAOA le lait et les produits laitiers)..... | 21 |
| Figure 4 : Réservoirs principaux de la flore microbienne des laits crus et principaux flux de flore les reliant (FA : Flore d'altération; FIT : Flore d'intérêt technologique; SDT : Salle de traite, MAT : Machine à traire ; + effet positif sur le niveau de flore ; - effet négatif sur le niveau de flore)..... | 35 |
| Figure 5 : Dégradation de carbone Rumen (d'après Chiquette et al. 2010)..... | 40 |
| Figure 6 : Anaérobiose et équilibre lactate / propionate dans le rumen (d'après Chiquette et al. 2010)..... | 41 |
| Figure 7 : Modèle de l'interaction des cellules de levure avec les bactéries du rumen, proposé par Jouany (2006)..... | 44 |
| Figure 8 : Modélisation de l'action des levures vivantes, proposé par Jouany (2006)..... | 45 |
| Figure 9 : Diagramme d'intervention des acteurs du projet. Groupe de travail composé de l'AFTALP, du CERAQ, du GTV, de EDS, d'une stagiaire ENVT, d'ACTALIA et de Philéo Lesaffre..... | 48 |
| Figure 10 : Protocole mis en place afin de répondre aux questions posées. Px : Prélèvement x, 1s : 1 semaine | 49 |
| Figure 11 : LDA (Linear Discriminant Analysis) des OTUs bactériens significativement différents pour le support lait et selon la période (avant, pendant et après)..... | 90 |
| Figure 12 : Abondance relative du Genre <i>Olsenella</i> selon le support et la période de distribution. La période a un impact seulement sur le support lait, où <i>Olsenella</i> est plus abondant lors de la période "pendant"..... | 91 |
| Figure 13 : LDA (linear Discriminant Analysis) des OTUs fongiques significativement différents pour le support air et selon la période (avant, pendant et après)..... | 91 |
| Figure 14 : LDA (Linear Discriminant Analysis) des OTUs fongiques significativement différents pour le support bouse et selon la période (avant, pendant et après)..... | 92 |

| | |
|---|------------|
| <u>Figure 15 : Abondance relative du genre Saccharomyces selon le support et la période de distribution. La période a un impact seulement sur le support bouse, où Saccharomyces est plus abondant lors de la période "pendant".....</u> | <u>92</u> |
| <u>Figure 16 : NMDS, répartitions des points représentatifs de l'écosystème lait selon la période.....</u> | <u>95</u> |
| <u>Figure 17 : NMDS, répartition des points représentatifs de l'écosystème air selon la période.....</u> | <u>95</u> |
| <u>Figure 18 Impacts microbiologiques de la distribution de levures vivantes Sc47 dans l'alimentation des vaches laitières : impacts sur les flores des différents réservoirs de flore du lait cru et flux de flore entre les réservoirs.....</u> | <u>99</u> |
| <u>Figure 19 NMDS, positionnement des écosystèmes fongiques du support trayon selon le numéro du producteur pour tous les points de prélèvement, Impact numéro producteur : adonis, p-value = 0,001 et beta dispersion, p-value = 0,837.....</u> | <u>103</u> |
| <u>Figure 20 : NMDS, positionnement des écosystèmes fongiques du support trayon selon que l'essuyage à sec est pratiqué pendant la traite, Impact « essuyage à sec » : adonis, p-value = 0,001 et beta dispersion, p-value = 0,2</u> | <u>104</u> |

Table des graphiques

| | |
|---|-----------|
| <u>Graphique 1 : Evolution des indices de biodiversité selon la taille de l'échantillon et la précision du séquençage semaine.</u> | <u>58</u> |
| <u>Graphique 2 : impact de la distribution de levures vivantes sur le dénombrement de SC dans le support de flore Air.....</u> | <u>63</u> |
| <u>Graphique 3 : Impact de l'ajout de levures vivantes sur le dénombrement de SC dans les Bouses.....</u> | <u>64</u> |
| <u>Graphique 4 : Impact de l'ajout de levures vivantes sur le dénombrement de Saccharomyces cerevisiae sur les trayons.....</u> | <u>65</u> |
| <u>Graphique 5 : Présence de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> chez l'éleveur 1 pour chaque prélèvement pour le support Bouse, un exemple.....</u> | <u>67</u> |
| <u>Graphique 6 : Présence de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> chez l'éleveur 1 pour chaque prélèvement pour le support Trayon, un exemple.....</u> | <u>68</u> |
| <u>Graphique 7 : Présence de SC chez l'éleveur 10 pour chaque prélèvement pour le support Lait, un exemple.....</u> | <u>69</u> |
| <u>Graphique 8 : Présence de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dans les Bouses chez l'éleveur 5 pour chaque prélèvement.....</u> | <u>70</u> |
| <u>Graphique 9 : Présence de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sur les Trayons chez l'éleveur 5 pour chaque prélèvement.....</u> | <u>71</u> |
| <u>Graphique 10 : Présence de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dans le Lait chez l'éleveur 5 pour chaque prélèvement.....</u> | <u>71</u> |
| <u>Graphique 11 : Présence de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dans l'air chez l'éleveur 5 pour chaque prélèvement.....</u> | <u>72</u> |
| <u>Graphique 12 : Répartition des dix OTUs bactériens majoritaires (abondances relatives les plus élevées) selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Air. Chaque diagramme vertical représente un prélèvement (de 1 à 7) et ce pour chaque éleveur (de 1 à 10).....</u> | <u>77</u> |
| <u>Graphique 13 : Répartition des dix OTUs bactériens ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Bouse.....</u> | <u>78</u> |
| <u>Graphique 14 : Répartition des dix OTUs bactériens ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Trayon.....</u> | <u>79</u> |

| | |
|--|-----------|
| <u>Graphique 15 : Répartition des dix OTUs bactériens ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Lait.....</u> | <u>80</u> |
| <u>Graphique 16 : Répartition des dix OTUs fongiques ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Air.....</u> | <u>81</u> |
| <u>Graphique 17 : Répartition des dix OTUs fongiques ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Bouse.....</u> | <u>82</u> |
| <u>Graphique 18 : Répartition des dix OTUs fongiques ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Trayon.....</u> | <u>83</u> |
| <u>Graphique 19 : Répartition des dix OTUs fongiques ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Lait.....</u> | <u>84</u> |

Table des tableaux

| | |
|--|----|
| <u>Tableau 1 Impact de la période sur le dénombrement des Germes totaux (GT) pour tous les supports prélevés. Résultat de l'analyse de variance, seuil de significativité, p-value < 0,05.....</u> | 59 |
| <u>Tableau 2 : Impact de la période sur le dénombrement des moisissures pour tous les supports. Résultat de l'analyse de variance et du test de Tukey HSD, seuil de significativité p-value < 0,05 (av : avant, pt : pendant, ap : après).....</u> | 60 |
| <u>Tableau 3 : Impact de la période de distribution sur le dénombrement des levures pour tous les supports. Résultat de l'analyse de variance, seuil de significativité p-value<0,05.....</u> | 61 |
| <u>Tableau 4 : Impact de la période sur le dénombrement des <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pour tous les supports. Résultat de l'analyse de variance et du test de Tukey HSD, seuil de significativité p-value < 0,05.....</u> | 62 |
| <u>Tableau 5 : Présence ou non de la souche Sc47 sur les différents support de flore (N : Non présence, 6 : présence de la souche Sc47 chez 6 éleveurs différents sur 10 pour ce numéro de prélèvement).....</u> | 73 |
| <u>Tableau 6 : Présentation des éleveurs concernés par la présence de levures vivantes Sc47 dans les échantillons trayon et bouse.....</u> | 74 |
| <u>Tableau 7 : Diversité alpha des bactéries dans les 4 supports prélevés et impact de la distribution de levures vivantes sur les indices de biodiversités (valeur de la moyenne des indices de biodiversité et leur écart type SD. On a un impact significatif de la période si $p < 0,05$ calculé grâce à une ANOVA).</u> | 85 |
| <u>Tableau 8 : Diversité alpha des fongiques dans les 4 support prélevés et impact de la distribution de levures vivantes sur les indices de biodiversités (valeur de la moyenne des indices de biodiversité et leur écart type SD. On a un impact significatif de la période si $p < 0,05$ calculé grâce à une ANOVA).....</u> | 88 |
| <u>Tableau 9 : Impact de la période de distribution de la levure sur l'écosystème bactérien des différents supports prélevés. Pour que l'impact soit positif, on veut une Adonis p-value < 0,05 et une Beta-dispersion p-value >0,05. NS : Non Significatif</u> | 93 |
| <u>Tableau 10 : Impact de la période de distribution de la levure sur l'écosystème fongique des différents supports prélevés. On veut de même que l'Adonis p-value < 0,05 et la Beta-dispersion p-value >0,05 pour que l'impact soit positif.....</u> | 94 |

| | |
|--|------------|
| <u>Tableau 11 : Impact de la période de distribution de la levure sur l'écosystème fongique de l'air. Pour considérer que l'impact est positif, il faut avoir Adonis p-value < 0,05 et Beta-dispersion p-value >0,05.</u> | <u>100</u> |
|--|------------|

Table des photographies

| | |
|---|-----------|
| <u>Photographie 1 : Prélèvement d'air grâce au Coriolis, élevage 10.....</u> | <u>52</u> |
| <u>Photographie 2 : Prélèvement d'air grâce au Coriolis en différents points du bâtiment.....</u> | <u>53</u> |

ABREVIATIONS

AA : Acide Aminé

AFTALP : Association des Fromages Traditionnels des Alpes Savoyardes

AG : Acide Gras

AOC : Appellation d'Origine Contrôlée

AOP : Appellation d'Origine Protégée

AVG : Acides Gras Volatil

CDC : Cahier des Charges

DAC : Distributeur Automatique de Concentrés

ENILV : Ecole Nationale de l'Industrie Laitière et de la Viande

IGP : Indication géographique Protégée

INAO : Institut National de l'Origine et de la Qualité

INRA : Institut National de la recherche agronomique

LDA : Linear Discriminant Analysis

LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine

MAT : Machine à Traire

MPG : Monopropylène glycol

ODG : Organisme de Défense et de Gestion

OTU : Operationnal Taxonomic Unit

SC : *Saccharomyces cerevisiae*

SDT : Salle de Traite

TB : Taux butyreux

TP : Taux protéique

UPB : Union des Producteurs de Beaufort

INTRODUCTION

Dans toutes les régions du monde, depuis la révolution de l'agriculture et la domestication des mammifères, le lait est une denrée alimentaire très utilisée, du fait de sa valeur alimentaire intéressante : source de matières grasses, de protéines et de minéraux. Le seul bémol de cet aliment est sa conservation. Tel quel et à température ambiante, le lait se conserve très mal. Or, la production de lait était saisonnière (mises-bas synchronisées avec la pousse de l'herbe). La transformation fromagère du lait a ainsi permis d'obtenir un produit et de le conserver jusqu'à l'hiver pour pouvoir se nourrir.

Aujourd'hui encore, bien que le produit fini soit spécifique à une région, la base de transformation est la même (coagulation du lait par un processus d'acidification) dans toutes les régions reculées où la population a basé sa survie sur la valorisation de produits laitiers (Dahan, Mingasson 2016) mais également dans nos régions fromagères de Savoie.

Les Savoie, grâce à leurs fromages protégés par des appellations font partie intégrante des zones de France valorisant leurs laits par l'intermédiaire de fromages de qualité. En effet, les Savoie concentrent 4 des 45 AOP¹ fromagères bovines de France (AOP Beaufort, AOP Reblochon, AOP fromage d'Abondance, AOP Tome des Bauges) et 3 des 4 IGP² fromagères de France (IGP Tomme de Savoie et IGP Emmental de Savoie + IGP raclette de Savoie) (Figure 1 et 2)

¹ Appellation d'Origine Protégée

² Indication Géographique Protégée



Figure 21 : Localisation géographique des Savoie
 ([wikipedia](#))

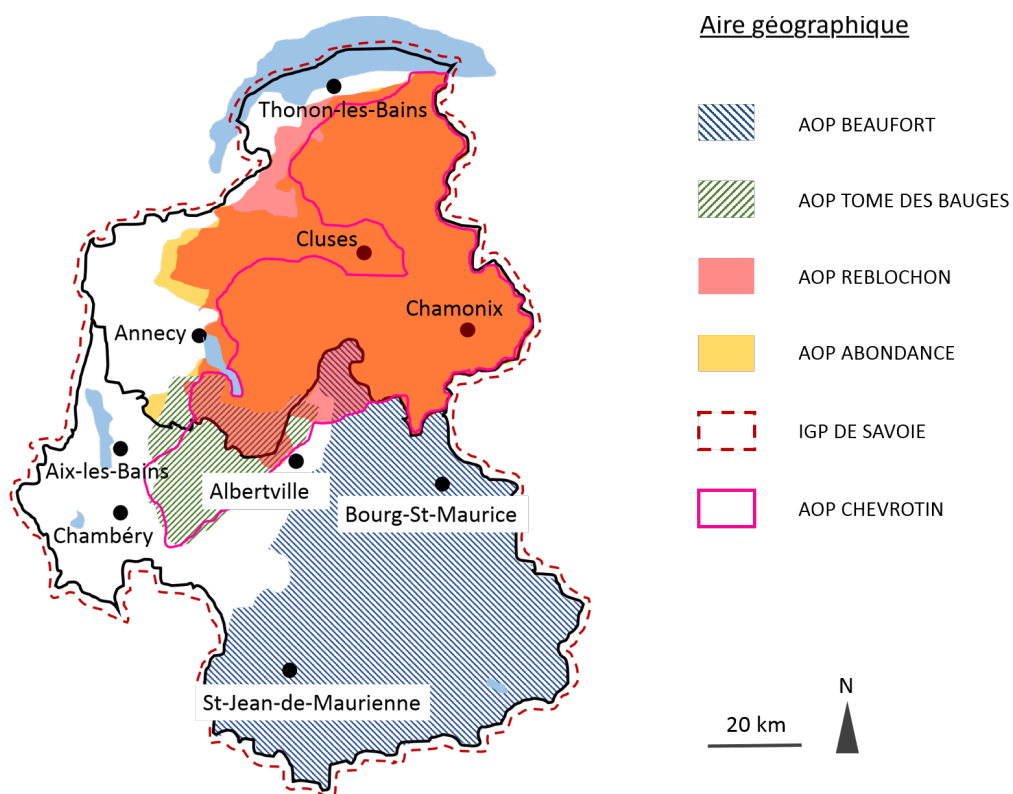


Figure 2 : Répartition géographique des AOP et IGP en Savoie et Haute-Savoie (d'après Penelope, stagiaire ceraq 2018)

La valorisation d'une production laitière de qualité permet aujourd'hui de maintenir une agriculture dynamique et innovante dans les régions les plus reculées des grandes vallées alpines. Cela n'a pas toujours été le cas et la valorisation de produits laitiers basés sur la qualité fut le défi de nos anciens des années 1900 à 1990.

Pour bien comprendre la valeur de ces appellations et le rôle qu'elles ont eu et ont toujours dans l'économie pastorale, développons un exemple avec le cas de l'AOP Beaufort.

C'est en 1860, lors du rattachement de la Savoie à la France, que l'aventure du Beaufort commence. En ce temps-là, les disparités sont importantes entre propriétaires terriens de fond de vallée ou d'alpage et petits agriculteurs de haute montagne. Le modèle d'agriculture de l'époque reposait en haute montagne sur des petits agriculteurs possédant, pour les plus riches, 15 vaches. Celles-ci étaient regroupées en été en alpage (fruit commun³) privé ou communal et les hommes restaient au village faire les foins et préparer la saison d'hiver. En hiver, le nombre de vaches restant au village était conditionné par la quantité de foin récolté ; chacun gardait quelques vaches pour sa consommation personnelle et les autres étaient mises en hivernage dans les vallées. Ce système reposait déjà sur le collectif puisque les grands propriétaires d'alpage dépendaient des petits agriculteurs et vice versa.

Mais l'Etat commence à s'intéresser au développement de l'agriculture et des ruraux. En effet, face à l'exode rural, l'urbanisation et l'industrialisation, la campagne et ses habitants font figure de stabilité sociale, politique et morale. Le régime républicain pousse à l'organisation collective facilitée par le développement des associations et des syndicats (autorisés en 1884) ; organisation déjà présente en haute montagne par l'intermédiaire des fruits communs.

La première étape pour permettre l'unification et le maintien d'une agriculture de montagne va passer par la définition de la race tarine et sa promotion lors des premiers comices agricoles locaux. Sa première présentation officielle au concours de Lyon se fera en 1861 (Lynch, Harvois 2016) .

³ Désigne le rassemblement de différents troupeau l'été en alpage pour la valorisation d'alpage communaux et la transformation en commun du lait en fromage

La deuxième grande étape a pour objectif d'améliorer la production fromagère. Le développement des fruitières est un autre pilier du processus de valorisation des alpages et de la production laitière et fromagère, ceci passe par l'organisation de production collective de fromage, déjà mise en place dans les fruits communs d'été. Au XXème siècle avec le début de l'exode rural et l'amélioration de la circulation des denrées alimentaires, l'autosuffisance alimentaire à l'échelle de l'exploitation agricole devient obsolète. Ainsi, la surface de terres labourées à destination de la production de céréales diminue. Ceci libère des terrains pour la production de foin. L'augmentation de la production fourragère va permettre aux agriculteurs de garder plus de vaches l'hiver et donc de produire plus de lait. D'où la volonté de créer des fruitières pour la production de fromage d'hiver.

La production fromagère va aussi être améliorée par la création en 1895 d'une école fromagère à Bourg Saint Maurice. Celle-ci prodigue une formation de fromager mais a également une vocation de contrôle par le biais de visite annuelle d'inventorisation des chalets fruitiers, réalisée par le chef fromager de l'école (inventaire/état des lieux, des équipements, du nombre de vaches, des pratiques...).

Jusqu'à la fin de la seconde guerre mondiale, le Fromage Beaufort s'organise petit à petit. C'est une première phase de développement de l'économie pastorale et laitière marquée par l'arrivée du progrès technique et de l'organisation collective autour de la tarine et de sa production, marqué également par la réaffirmation de l'organisation en fruit commun et une première homogénéisation des productions grâce à l'école de fromager. Tout ceci pour arriver en 1941 à la première définition du Beaufort : Gruyère Beaufort de Haute montagne de Savoie.

S'en suit pendant les 30 glorieuses la révolution silencieuse de l'agriculture de Savoie. Face à une agriculture nationale qui se veut rationnelle, intensive, à exploitation individuelle et tournée vers la grande distribution, les montagnards s'organisent de manière collective, réaffirment leur volonté de se tourner vers un produit de qualité et typique de leur terroir. L'agriculture de montagne n'aurait pas été permise sans une organisation collective des habitants afin de survivre dans des conditions difficiles. Cette collectivité est le sceau des AOP de Savoie ; de 1950 à 1960 les premières coopératives à gestion directe voient le jour, les agriculteurs réunissent leurs productions été comme hiver. L'organisation des producteurs en

UPB⁴ est une étape décisive dans l'histoire des fromages et permettra en 1968 la reconnaissance de l'AOC⁵ Beaufort.

Cependant l'agriculture de montagne demeure fragile, la désertification se fait sentir et avec elle le manque de main-d'œuvre. Maxime VIALLET, figure incontournable de la création de l'AOP beaufort, contacte dès 1971 Germain MOCQUET, responsable du département laitier de l'INRA⁶. D'importants échanges se mettent en place afin de faire un état des lieux des pratiques des agriculteurs de montagne et de leurs besoins. Les principales améliorations qui en découlent sont tournées vers la qualité du lait avec, à partir de 1973, un paiement du lait à la qualité, une amélioration de l'affinage et de la valorisation des terrains et de leur enrichissement. Ce n'est pas tout, la seconde révolution de l'agriculture de montagne et plus particulièrement de l'exploitation des alpages est lancée par la création du premier prototype de machine à traire mobile. En parallèle, la clôture électrique fait son apparition. Ces innovations transforment l'économie pastorale et solutionnent le problème de la main-d'œuvre (Lynch, Harvois 2016).

C'est la relance du fruit commun et de l'exploitation des grands alpages de montagnes.

L'économie alpestre se tourne vers une production de fromages de qualité finement enchevêtrée avec les différents aspects de la notion de terroir. En effet, le terroir englobe des facteurs humains et naturels liés à une zone géographique qui ont un impact direct ou non sur les caractéristiques des fromages.

Bien que chaque fromage des Savoie ait emprunté un chemin un peu différent pour parvenir à l'obtention d'une AOP, tous ont traversé ces grandes étapes avec en tête des objectifs communs : mobilisation des ressources locales (fourragères (Delaby, Peyraud 2009) et savoir-faire) pour aboutir à un produit typique et de qualité, ancré dans la société locale (économie, aménagement du territoire, identité locale) (Dubeuf, Burleraux 1996).

⁴ Union des Producteurs de Beaufort

⁵ Appellation d'Origine Contrôlée

⁶ Institut national de la recherche agronomique

La notion de terroir a un lien non négligeable avec la typicité de ces produits :

- Les prairies de montagne présentent une flore ayant une grande diversité d'espèces comprenant en particulier de dicotylédones (lait obtenu riche en terpènes) ; cette flore particulière va permettre d'obtenir des laits spécifiques des pelouses alpines ou des pâtures de vallée (Coulon et al. 2000), la diversité florale des alpages et des pâturages ainsi que les pratiques culturales (fertilisation, stade végétatif à la récolte...), caractérisant en partie le terroir, ont un impact réel sur la diversité des laits et donc sur la saveur et l'odeur des fromages (Martin et al. 2003 ; Martin, Buchin, Hauwuy 2005).

- La valorisation et la sélection des races locales a également son importance ; leurs bonnes aptitudes à évoluer dans les pentes et leurs qualités fromagères en font des races réellement adaptées à la vie en montagne (Lambert-Derkimba et al. 2007 ; 2010). La race Tarentaise, plus familièrement appelée Tarine, autorisée avec la race Abondance par le cahier des charges du Beaufort depuis 1986 (Dubeuf, Burleraux 1996), présente une aptitude fromagère particulière. Seule la race Tarentaise présente un variant particulier de la caséine Kappa : le variant C. La caséine Kappa est essentielle à la coagulation du lait cru car c'est de son hydrolyse par la présure que dépend cette phase ; plus le taux de caséine kappa augmente plus le lait présente une aptitude élevée à la coagulation. Bien qu'associé à des temps de coagulation plus longs que les variants A et B, le variant C présente un temps de raffermissement intermédiaire par rapport aux variants A et B (Lynch, Harvois 2016 ; Delacroix-Buchet, Lefier, Nuyts-Petit 1992). Les races Tarine, Abondance et Montbéliarde participent donc toutes trois à la caractérisation des AOP (AOP Beaufort, AOP Reblochon, AOP Fromage d'Abondance et AOP Tome des Bauges) (INAO 2012a, 2007, 2012b, 2015a) et des IGP (IGP Emmental de Savoie et IGP tomme de Savoie+ IGP Raclette de Savoie) (INAO 2015b ; 2015c ; 2015d).

- Une dernière particularité du terroir entre en jeu pour impacter les qualités organoleptiques des fromages : la flore des laits. En effet, la totalité des fromages de Savoie est fabriquée à partir de laits crus, c'est-à-dire qu'aucun traitement thermique n'a été appliqué au lait avant son emprésurage (température inférieure à 40°C). Toutes les flores des laits sont donc conservées. Cette flore spécifique a un effet sur la richesse et la diversité des profils aromatiques des fromages (Bouton 2001). Ceci

est permis par une protéolyse plus importante dans du lait cru que dans du lait pasteurisé et par une concentration plus élevée en composés volatils par exemple (Buchin, Beuvier 2000). La flore microbienne est une des grandes spécificités du lait cru et par conséquent une explication de la typicité des fromages de Savoie.

Ces fromages sous appellation AOP ou IGP ont depuis longtemps convaincu le consommateur, notamment avec leur lien étroit au terroir. Ils reflètent le caractère extensif des élevages de Savoie.

Dans un contexte où l'économie pousse à la production, à l'intensification et à la rationalisation des systèmes agricoles, les producteurs des Savoie ont plus que jamais besoin de ces valorisations sous appellation pour continuer à exister et à faire perdurer les savoir-faire ancestraux relatifs à la transformation fromagère.

Bien que la production soit encore maîtrisée avec le maintien de quotas par l'intermédiaire de « contrats » et la limitation de la production laitière par vache dans certaines AOP, les volumes produits augmentent au risque de voir apparaître un décalage important entre la réalité et l'image véhiculée par le marketing.

Le lien au terroir s'affine également avec l'apparition de lait « paucimicrobien » en lien avec la volonté des agriculteurs de baser leur qualité du lait sur le paiement à la qualité (Pinard et al. 2014), sans que l'on connaisse encore précisément les conséquences de l'utilisation de ces laits appauvris sur les caractéristiques des fromages (Bouton 2009 ; Monsallier et al. 2016).

Il est donc de plus en plus courant aujourd'hui, en Savoie et Haute-Savoie, de voir apparaître des pratiques agricoles se rapprochant des pratiques de l'agriculture moderne intensive. Bien que toujours basé sur la valorisation des ressources fourragères locales et sur l'implication de races locales de vaches laitières dans la production, on peut se demander si un système basé sur une vache de race Abondance produisant 9000L de lait par lactation et avec une alimentation basée sur du foin mais avec une part non négligeable d'ensilage d'épis de maïs sur une période de l'année, n'est pas une forme d'intensification ?

Il est donc compréhensible de voir apparaître dans nos régions l'utilisation d'auxiliaires alimentaires, au sens large, dans les rations des vaches laitières, avec pour objectifs, selon les éleveurs et les vendeurs (Clignac 2016) : prévenir les maladies nutritionnelles (acidose, maladie la plus fréquente en système intensif), limiter les carences ou encore augmenter les performances zootechniques.

Les trois auxiliaires principalement utilisés sont le monopropylène glycol (MPG), les acides aminés (AA) et les levures vivantes. Les éleveurs interrogés sur l'utilisation de ces intrants en filière lait cru, sont interpellés par l'influence que pourrait avoir l'ajout de micro-organismes (essentiellement levure vivante) sur la flore des laits (Clignac 2016).

C'est également une question que se pose l'AFTALP⁷. En effet, les CDC⁸ n'ont pas modifié la réglementation des auxiliaires alimentaires ; actuellement ces auxiliaires ne font pas partie de la liste positive des matières premières ou des additifs autorisés (ANNEXE 1 : Les Cahiers des Charges et les levures vivantes). Ils ne sont donc pas officiellement autorisés. Or une étude réalisée en 2016 (Clignac 2016), montre une utilisation fréquentes du MPG, des AA et des levures vivantes. Les exploitations agricoles qui les utilisent ont comme objectif d'exploitation : la production laitière et/ou la qualité de la ration (Clignac 2016). On retrouve dans ce constat l'orientation caricaturale de l'agriculture savoyarde, à savoir une orientation vers une production importante mettant la qualité au deuxième plan, même si cela peut encore être nuancé par l'application des Cahiers Des Charges.

C'est pourquoi, l'AFTALP et différents partenaires ont mis en place une étude qui vise à vérifier l'impact des levures vivantes sur la fromageabilité des laits crus sous appellation.

Après un état des lieux rapide sur les connaissances actuelles de la flore des laits crus et de leurs rôles dans la fromageabilité des laits, nous verrons pourquoi les levures vivantes sont utilisées dans l'alimentation des vaches laitières et par quels mécanismes ces levures ont un impact. Enfin, la méthodologie de l'étude sera décrite ainsi que les résultats obtenus.

⁷ Association des Fromages Traditionnels des Alpes Savoyardes

⁸ Cahiers des Charges

1 LES FLORES DES LAITS CRUS : ETAT DES LIEUX (ORIGINE, INTERET ET DEVENIR)

La définition du lait est donnée principalement par le décret du 25 mars 1924 en application de la loi du 1^{er} août 1905 (loi contre la répression des fraudes). Le lait est défini comme « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée ».

Cette matière première, valorisée depuis la domestication des grands mammifères pour nourrir les populations, est composée en grande partie par de l'eau mais également par des matières grasses, des protéines, des glucides et des matières minérales (Figure 3)

| | | |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Eau | | 900-910g |
| | MG | 35-40 g |
| E.S.T 125-130g | | Protéines 30-35 g |
| | E.S.D 90-92g | Glucides 45-52 g |
| | | Matières Minérales 7,5-8 g |

Figure 3 : Composition du lait. ESD : extrait sec Dégraissé, EST : Extrait Sec Total, MG : Matière Grasse (Cours HIDA OA le lait et les produits laitiers).

Une dernière composante est également à prendre en compte : la flore microbienne des laits crus. Cette flore est représentée par une flore d'intérêt technologique, une flore d'altération et une flore pathogène. C'est la première qui nous intéresse ici, les deux suivantes étant à limiter. En effet, les fromages de Savoie valorisés sous appellation sont exclusivement fabriqués à partir de lait cru. Le

lait cru, matière première des fromages, n'a donc subi aucun traitement thermique supérieur à 40°C avant l'emprésurage (décret du 25 mars 1924 et arrêté ministériel du 13 juillet 2012). A cette température d'emprésurage, La totalité des populations microbiennes est conservée et il est nécessaire qu'elles le soient, les flores des laits crus ayant un rôle central dans la transformation fromagère et donnant toute leur typicité aux fromages des Savoie (Buchin, Beuvier 2000 ; Bouton 2001 ; Bouton, Grappin 1995 ; Fretin 2016).

Or depuis quelques années, les opérateurs des filières fromagères (fromagers, producteurs...) constatent un appauvrissement de cette flore microbienne spécifique des laits crus des Savoie et plus particulièrement une diminution des populations microbiennes d'intérêt fromager. Des laits « pauci-microbiens » font leur apparition en lien avec le renforcement du paiement du lait à la qualité (Michel, Chamba, Hauwuy 2000) (notamment sanitaire : qualité microbiologique et cellulaire) déjà présent depuis la loi Godefroy du 3 janvier 1969. Il est donc nécessaire lorsque l'on parle de lait cru d'en connaître la flore et d'envisager ce qui pourrait la modifier.

Dans ce premier chapitre seront donc développées les caractéristiques de la flore des laits crus en Savoie et leurs rôles sur les caractéristiques sensorielles des fromages. Enfin, nous verrons rapidement en quoi cette flore peut être influencée par certaines pratiques d'élevage.

1.1 Caractérisation et rôle de la flore des laits crus

Depuis les années 50, les flores microbiennes sont montrées du doigt, au contraire de la « pasteurisation » qui est présentée comme un gage de qualité.

On sait depuis 20 ans, que la flore microbienne des laits est un lien très fort unissant le lait et le fromage au terroir. Sa présence est nécessaire pour donner aux fromages toutes leurs saveurs et leurs odeurs. Le microbiote du lait est composé en grande majorité par des bactéries mais également par des levures, des moisissures et des virus.

1.1.1 Flores d'intérêt fromagères

Le lait est considéré comme stérile à la sortie de la mamelle. Ainsi, le terme de « microflore du lait cru » correspond à desensemencements du lait à partir de différents réservoirs de l'exploitation. Chaque lait issu de différentes exploitations et arrivant dans la salle de transformation présente donc une flore propre.

Les microorganismes présents dans le fromage sont le résultat d'ensemencements à partir du matériel de transformation, de la présure et de son levain, de la morge⁹, de la saumure (principale source de levures), des planches d'affinage.

Seule la microflore présente dans le lait cru avant emprésurage sera abordée ici.

1.1.1.1 Les bactéries

Les bactéries lactiques : d'un point de vue phylogénique, ces bactéries sont gram positive, produisant de l'acide lactique par la fermentation des glucides simples. Elles tolèrent des pH acides et sont aérobie-anaérobie facultatives.

Ces bactéries lactiques (10 à 100 ufc/mL) sont principalement représentées par le phylum des Firmicutes (les *Lactocoques*, *Leuconostocs*, *Pédiocoques*, *Streptocoques thermophiles*, *Lactobacilles mésophiles* et *thermophiles* et enfin les *Entérocoques*). Leur rôle principal est d'acidifier le lait et le caillé. Elles participent également à la formation du goût et ont un impact sur la texture du fromage (Bouton 2014 ; Laithier et al. 2011).

Les bactéries propioniques : phylogéniquement ce sont des bactéries gram positive (en moyenne 10 ufc/mL), fermentant le lactate en acide acétique, en acide propionique et en CO₂. Elles participent à la formation du goût et à l'ouverture des fromages à pâte pressée cuite (formation des yeux de la pâte) (Bouton 2014).

Microcoques, staphylocoques non pathogènes et bactéries corynéformes : bactéries gram positives de flore de surface des fromages affinés (100 à 1000

⁹ Morge : solution constituée de sel et de microorganismes, utilisée pour frotter les fromages lors de la phase d'affinage pour former la croûte

ufc/mL). Elles ont un rôle essentiellement dans la formation du goût (croute lavée, fleurie ou croute mixte) (Bouton 2014) et des couleurs. Paradoxalement, les corynébactéries les plus ubiquistes comme *Arthobacter* bien qu'ayant une activité protéolytique et lipolytique importante, n'ont pas de rôle central dans l'élaboration du goût au contraire des espèces *Brevibacterium linens* et *B. aurantiacum*, par exemple, à l'origine d'une création importante de goût (Laithier et al. 2011).

1.1.1.2 Les levures et champignons

Les levures : elles sont largement répandues dans l'environnement et donc dans le lait (10 à 100 ufc/mL). Les levures sont toujours présentes de manière plus importante à la surface qu'à l'intérieur des fromages, leur rôle est de désacidifier la pâte au début de l'affinage par assimilation du lactate, formation de métabolite alcalins et libération d'hormones de croissance ; ceci pour permettre l'implantation d'une flore bactérienne superficielle acido-sensible et halotolérante comme les bactéries corynéformes ou les staphylocoques. La neutralisation de la pâte permet également la modification de sa texture, l'optimisation de l'activité enzymatique et la répartitions des minéraux au sein du fromage (Vassal et al. 1986 in Cholet 2006). Les levures interviennent dans la flaveur des fromages affinés par la production de composés aromatiques, soit directement par la production d'une grande variété de composés aromatiques, soit indirectement, par production d'enzymes protéolytiques et lipolytiques (Cholet 2006).

Les AA sont les précurseurs de nombreux composés aromatiques. Par exemple, *Saccharomyces cerevisiae* transforme la L-méthionine en un composé soufré le methanethiol, par différentes voies enzymatiques.

Les levures restent très actives jusqu'à la fin de l'affinage au contraire de nombreuses flores qui disparaissent bien avant la fin de l'affinage. Enfin, les levures ont un impact très important sur l'équilibre des flores. Il existe de très nombreuses interactions entre les levures elles-mêmes et entre les levures et les bactéries (Bonaiti 2004 ; Cholet 2006).

Les moisissures : participent à la caractérisation majeure de certains fromages (*P. camemberti*), et induisent des caractéristiques sensorielles spécifiques (Bouton 2014).

1.1.2 Micro-organismes responsables d'altérations

Certains micro-organismes peuvent induire des transformations nuisibles à la qualité des produits ; par exemple par dégradation de certains constituants (protéines, lipides...) et/ou la libération de composés indésirables.

1.1.2.1 Les bactéries

Les coliformes peuvent être responsables des gonflements précoces des fromages (pâte molle, aspect spongiforme).

Les bactéries psychrotrophes (genres *Pseudomonas* ou *Bacillus*) produisent des lipases et des protéases extracellulaires qui génèrent des défauts de goût et des défauts de couleur (croutes bicolores...).

Les bactéries butyriques (*Clostridium tyrobutyrium*) participent à des défauts de goût et peuvent être responsables d'ouverture (gonflement tardif) des fromages à pâte pressée cuite.

1.1.2.2 Les levures-moisissures

Selon le type de fromage, le *Mucor* par exemple, peut-être un agent d'altération (pour le Reblochon) ou non (pour la Tomme de Savoie) (Bouton 2014 ; Fretin 2016).

1.2 Facteurs affectant le développement des germes dans le lait

Une des composantes du lait cru est sa microflore. Cette flore spécifique est intégrée dans un écosystème où un équilibre s'établit entre les micro-organismes et le milieu. Du lait au fromage les micro-organismes s'entraident, entrent en compétition, se supportent, se détruisent. L'ensemble de ses interactions gouverne la structure des communautés microbiennes et leurs activités.

Les facteurs environnementaux, comme la température, de même que les facteurs intrinsèques au lait vont venir perturber cet équilibre. On est en présence d'un état stable de non-équilibre.

1.2.1 Facteurs intrinsèques

Le lait est un milieu riche et varié. Les paramètres le caractérisant vont influencer l'activité de la microflore. En effet, chaque micro-organisme a des exigences nutritionnelles et physiques spécifiques.

Le pH

En général, le pH optimal de la flore des laits est proche de la neutralité. Cependant quelques bactéries se différencient par leur capacité à se développer à des pH bas, c'est le cas des bactéries lactiques qui participent à l'acidification du lait lors des premières étapes de la transformation fromagère. Les levures interviennent ensuite en désacidifiant la pâte, permettant ainsi à des bactéries de surface acido-sensibles de s'installer, comme les corynéformes, et de travailler sur le goût du fromage (Laithier et al. 2011 ; Beuvier, Feutry 2005).

1.2.1.1 L'activité de l'eau (aw)

Cet indicateur correspond à la quantité libre d'eau disponible pour le développement des micro-organismes et le bon fonctionnement de leurs activités enzymatiques et chimiques. Les molécules d'eau souvent sont liées à certains composants du lait, ce qui en diminue l'activité (Beuvier, Feutry 2005). Cet indicateur est conditionné en début d'affinage par la teneur en NaCl (bactéries halophiles) (Laithier et al. 2011).

1.2.1.2 Le potentiel d'oxydoréduction

Ce potentiel est la résultante de l'équilibre entre des réducteurs et des oxydants. Cela influence le développement de la flore en jouant sur ses besoins en oxygène. Ainsi, les micro-organismes plutôt aérobies se retrouvent en surface des fromages (corynébactéries), au contraire des micro-organismes anaérobies qui se développent au cœur des fromages à l'exemple des bactéries propioniques (Laithier et al. 2011). L'activité de certaines bactéries peut modifier le milieu, en le rendant plus anaérobie par exemple, ce qui le rendrait plus favorable ou hostile à l'activité d'autres bactéries ayant un rôle différent (Beuvier, Feutry 2005).

1.2.1.3 Composition en nutriments

Le lait est composé de divers nutriments comme le lactose, des vitamines, des minéraux, des acides aminés, des protéines et des matières grasses. Ces éléments sont disponibles pour l'activité des bactéries et des champignons, s'ils possèdent le système enzymatique nécessaire pour le métaboliser. Cette composition fine est influencée par les pratiques d'élevage dont l'alimentation (Beuvier, Feutry 2005 ; Laithier et al. 2011). Fréтин 2016 a eu la confirmation que l'alimentation a un effet sur la texture du fromage, en lien avec composition en matière grasse du lait via la concentration en C18:1cis9 et en C16:0. La texture des fromages fabriqués avec des crème issues de lait de vaches au pâturage (plus riche en C18:1cis9 et en acides gras polyinsaturés), est plus souple, plus fondante, plus collante que celle des fromages réalisés avec des crèmes issues de lait de vaches nourries à l'ensilage de maïs (plus riche en acide gras saturé à chaîne courte et en C16:0) (Fretin 2016). La composition fine du lait en matières grasses influence principalement l'équilibre entre la flore indigène et la floreensemencée (levain) au niveau de la croûte des fromages (Fretin 2016).

1.2.2 Facteur extrinsèque

La température de conservation du lait est un paramètre complexe. Officiellement, la température de conservation du lait ne devrait pas dépasser 4°C.

Or, il a été remarqué à maintes reprises que conserver du lait cru à cette température affecte de manière irréversible la fromageabilité de ce lait. En effet, les micro-organismes du lait cru ne sont pas tous affectés de manière identique par une température donnée. La plupart des bactéries du lait sont mésophiles (comme les bactéries lactiques *Lactocoques*) mais ce n'est pas le cas de toutes. D'autres sont psychrotrophes ou encore thermophiles (Laithier et al. 2011 ; Beuvier, Feutry 2005).

Dans les années 1950, lors de la création des premières coopératives à gestion directe en AOP Beaufort, l'organisation des « mènes » afin de récolter le lait était complexe et onéreuse à mettre en place. Le lait étant transformé « chaud », la collecte avait lieu deux fois par jour. Il a rapidement été affirmé que le tank, plus économique puisqu'il conservait le lait plus longtemps, était un modèle d'avenir. Les premiers essais ont été catastrophiques, aucun fromager n'a réussi à transformer du lait conservé douze heures à 4°C (Lynch, Harvois 2016), les fromages lainaient. Les responsables ont donc décidé que le report du lait n'était pas adapté au fromage

AOP Beaufort et la collecte journalière a repris. Du point de vue de la microflore des laits crus, le report du lait et sa conservation à basse température ont un impact sur la fromageabilité du lait cru.

On ne sait toujours pas aujourd'hui expliquer finement les modifications rencontrées lors du report du lait. Il est dit que conserver du lait à 4°C ou à 8°C pendant 24 heures n'a pas d'impact significatif sur la microflore (Berodier 2009). Par contre, conserver du lait à 12°C pendant 24 heures entraîne une augmentation d'une microflore utile (*Lactocoques*) mais aussi de deux microflores indésirables (coliformes et *Pseudomonas*) (Berodier 2009).

Sous appellation aucun lait n'est transformé 24h après la traite. On ne sait pas finement quelles sont les modifications de la microflore générées par le report du lait. Certains cahiers des charges de fromages d'appellations recommandent donc de conserver le lait à environ 12°C et de ne pas descendre en dessous de 4°C (INAO 2007, 2012a) lorsqu'il y a report de plus de 6h.

1.3 Influence des pratiques d'élevages sur les réservoirs de flore des laits et sur la microflore des laits crus

La biodiversité est définie par le journal officiel du 12 avril 2009 comme « la diversité des organismes vivants, qui s'apprécie en considérant la diversité des espèces, celle des gènes au sein de chaque espèce, ainsi que l'organisation et la répartition des écosystèmes ». Il a déjà été souligné le rôle indéniable de la microflore du lait cru sur la typicité des fromages et leur lien au terroir. Il est donc légitime de s'interroger sur l'adaptation des pratiques d'hygiène pour préserver au mieux la biodiversité du lait cru.

Les pratiques d'hygiène sont définies « par l'ensemble des principes et des pratiques tendant à préserver et améliorer la santé ». A priori, les pratiques permettant d'éliminer spécifiquement les pathogènes et de conserver les flores utiles ne sont pas connues, il est donc préférable de protéger les écosystèmes naturels. En filière fromagère, cela implique la conservation des pratiques traditionnelles et le raisonnement des pratiques d'hygiène.

Le lait est considéré comme stérile à sa sortie de la mamelle. La flore du lait cru résulte d'ensemencements successifs par différents réservoirs.

1.3.1 Principaux réservoirs de la flore des laits cru et flux microbiens

1.3.1.1 Contexte

Globalement, les acteurs des filières fromagères rapportent une diminution des flores utiles dans le lait cru. Il y a en effet une différence entre les attentes des producteurs et celles des fromagers. Les producteurs visent une qualité du lait optimale en lien avec un niveau de flore totale le plus bas possible, au contraire des fromagers qui attendent des laits ayant une bonne fromageabilité, soit un niveau en flore utile élevé.

Une étude comparant des laits pauci-microbiens (germes totaux < 5000 germes /mL) à des laits crus plus chargés en germes, a montré qu'en valeurs relatives les proportions de flores utiles étaient environ les mêmes, voire un peu plus faibles dans les laits pauci-microbiens. En valeur absolue, le nombre de *Lactocoques* des laits pauci-microbiens était plus faible (Bouton 2009). Cependant, lorsqu'on compare la qualité finale des fromages fabriqués à partir de lait pauci-microbien ou de lait plus chargé en flore totale, la différence n'est pas forcément celle à laquelle on peut s'attendre a priori. Un niveau faible en flore utile dans le lait n'engendre pas forcément un niveau faible en ces flores dans le fromage affiné. Il y a deux explications possibles à cela.

D'abord, d'autres sources d'ensemencement peuvent entrer en jeu en cours de fabrication du fromage comme les moules, les toiles, la présure sur recuite ou encore les tables d'affinage (Laithier et al. 2011). Ceci est corroboré par l'étude de l'influence de la technologie sur le lait selon son niveau en germes totaux. Les fromages, issus de laits crus globalement moins chargés en germes, présentent un écart sensoriel important selon que la transformation est laitière ou fermière. Les laits crus, chargés en microflore sont moins influencés par la technologie fromagère ; les fromages laitiers ou fermiers qui en découlent sont globalement plus similaires entre eux. Un lait chargé en microflore permet de réaliser un fromage dont les caractéristiques organoleptiques dépendent des conditions de production du lait. Ces caractéristiques sont moins influencées par la technologie fromagère lorsque le lait est riche en microflore. (Convert 2012).

D'autre part, comme la plasticité du génome est importante et le temps de multiplication bactérienne est court, les micro-organismes des souches fromagères sont capables de s'adapter très rapidement à des environnements différents. Par exemple, *Lc. Lactis* ou *Arthrobacter* sp peuvent subir des modifications génétiques

par mutation du génome ou par transfert de gène, ce qui favorise leur développement dans le fromage. Ainsi, des micro-organismes sous-dominants dans le lait peuvent avoir l'opportunité de se développer plus facilement dans des environnements qui leur sont plus favorables comme le milieu fromage (Fretin 2016). La charge globale d'un lait cru ne reflète pas réellement sa fromageabilité. Une espèce abondante peut assurer des fonctions essentielles (comme les bactéries lactiques) sans pour autant être la clef de voûte de l'écosystème ; à l'inverse, une espèce peu présente peut jouer un rôle déterminant. Au-delà de la quantité de micro-organismes présents, c'est la nature de cette microflore qui contribue à la typicité des fromages au lait cru (Bouton 2009). Il faut cependant conserver un certain niveau de flore et sa biodiversité pour avoir une bonne influence des flores sur la spécificité des fromages. Cela passe par une bonne connaissance des réservoirs de la flore des laits crus et des flux microbiens entre ces réservoirs. Aujourd'hui, le lait cru conserve encore une bonne typicité par la grande variété des groupes d'intérêt fromager et la faible présence de groupes microbiens d'altération (Michel, Hauwuy, Chamba 2001).

1.3.1.2 Les principaux réservoirs de flore et les flux entre eux

Il est maintenant courant de considérer le trayon comme le réservoir principal influençant la microflore des laits crus. La flore de ce réservoir est caractérisée par une forte diversité de groupes microbiens mais présentant une dominance de la flore d'intérêt fromagère appartenant au phylum Firmicutes : flore acidifiante mésophile et flore halophile. On retrouve donc une flore acidifiante à un niveau de 10^6 à 10^7 ufc/2trayons, des Entérocoques à 10^5 ufc/2trayons, des flores d'affinage à hauteur de 10^3 - 10^4 ufc/2trayons. Les flores indésirables d'altérations sont cent fois moins présentes (Laithier et al. 2011 ; Michel, Hauwuy, Chamba 2006).

On retrouve sur les trayons avant préparation des groupes microbiens d'intérêt technologique aussi présents dans le lait (Verdier-Metz et al. 2011 ; Mallet et al. 2013). Cette hypothèse est confirmée par l'impact négatif des pratiques de traites hygiénistes sur les flores d'intérêt technologique présentes dans le lait, notamment les *Staphylocoques* et les *Corynébacteriums* (Mallet et al. 2013).

La flore des trayons est influencée par différents facteurs environnementaux. Outre l'hygiène de traite qui sera abordée plus tard, le premier facteur à envisager est le facteur saison. En effet, le niveau de flore au niveau du trayon diminue d'un facteur quatre l'été (Monsallier et al. 2014 ; Joandele 2007 ; Convert 2010 ; Bouton et al. 2005). Selon la saison, la litière est en effet modifiée ainsi que l'alimentation.

L'hiver, les vaches sont logées à l'attache en bâtiment (stabulation entravée) ou en stabulation libre, sur tapis, paille ou encore sciure. Comme celle des trayons, la microflore de la litière est représentée à 95% par des bactéries d'intérêt technologique. Quant aux levures et moisissures, on les retrouve à hauteur de 3 log ufc/trayons (Monsallier et al. 2014). Une corrélation positive a été mise en évidence entre la flore de la litière type tapis, paille ou sciure et la flore des trayons. Les tapis et la sciure présentent des niveaux plus importants en flore totale et cela a un impact positif sur le niveau de la flore des trayons. Plus particulièrement, les tapis sont associés à un niveau plus important de flore acidifiante mésophile sur les trayons (Joandele 2007 ; Convert 2010). On a donc bien un flux de flore depuis la litière vers le trayon. Aucune corrélation litière-lait n'a par contre pu être mise en évidence (Monsallier et al. 2014).

L'été, les vaches dans les élevages AOP sont obligatoirement au pâturage (INAO 2007, 2012a, 2012b, 2015a). Il existe une relation, bien qu'encore non complètement comprise, entre la phyllosphère, le sol et la peau des trayons d'un point de vue microbien. On sait notamment que la diversité botanique et la fertilisation des sols peuvent modifier la biodiversité, l'abondance et l'activité de la communauté microbienne des sols. Ceci peut ainsi affecter la flore des trayons en contact avec le sol (Fretin 2016 ; Montel, Bouton, Parguel 2012).

La flore des trayons est donc influençable par de nombreux facteurs environnementaux. Les pratiques d'hygiène de traite ont également un rôle très important sur les trayons.

La flore présente dans la machine à traire est peu diversifiée par rapport à la flore présente sur les trayons. Quantitativement, le niveau de flore utile est identique à celui de la flore d'altération (Michel, Hauwuy, Chamba 2006). La machine à traire demeure un réservoir secondaire d'ensemencement du lait cru par la présence de biofilms (Michel 2005). Des souches de micro-organismes présents dans l'eau résiduelle de rinçage de la machine à traire ont des profils similaires à ceux retrouvés dans le lait cru (Mallet et al. 2013).

L'efficacité de rinçage et les types de lessives utilisées influencent directement le profil des flores. L'étude des eaux résiduelles de rinçage met en évidence la présence de résidus de produits lessiviels (défaut de conception de la machine à traire ou trop faible volume d'eau pour rincer la machine) (Michel 2005). Ceci a pour conséquence de diminuer l'aptitude à la coagulation des laits.

Certaines AOP commencent à s'intéresser aux types de lessives utilisées : chlorées ou non. Bien qu'aucune modification globale de la flore n'ait été montrée, on sait en regardant plus précisément la nature des flores et leur équilibre plutôt que la quantité de germes totaux, qu'une lessive chlorée engendre une augmentation des entérocoques alors qu'une lessive non chlorée entraîne une augmentation des levures et des lactobacilles hétérofermentaires.

Enfin, l'air ambiant de la salle de traite est potentiellement un réservoir d'ensemencement du lait cru, il contient des bactéries d'affinage et des bactéries lactiques mésophiles (Laithier et al. 2011). Des études montrent que, comme dans la machine à traire, la flore d'intérêt technologique est au même niveau que les flores d'altérations. Il existe cependant une corrélation entre la flore des laits crus et la flore de l'air ambiant, ce qui laisse penser que ce support est un milieu d'ensemencement du lait dans la salle de traite (Michel, Hauwuy, Chamba 2006 ; Mallet et al. 2013).

L'air de la salle de traite peut être affecté par l'activité dans l'étable, le taux de renouvellement de l'air, la température et l'humidité du bâtiment, les conditions de récolte et de stockage du fourrage ou encore par l'utilisation d'un produit asséchant tel que la bentonite qui diminue la poussière et les micro-organismes (levures et moisissures) dans l'air ambiant. En effet, un flux de circulation microbien aéroporté a été mis en évidence entre l'air de l'étable et l'air de la salle de traite (Montel, Bouton, Parguel 2012).

1.3.2 Focus sur l'influence des pratiques d'élevages

Tous les producteurs, bien que soumis aux mêmes variations météorologiques et saisonnières, ne produisent pas le même type de lait. Le niveau et la nature des flores ne sont pas dus au hasard, mais résultent des différences de pratiques d'élevages et notamment en ce qui concerne l'hygiène de traite ou encore le lavage de la machine à traire (Michel, Hauwuy, Chamba 2001). Cette étude met bien en évidence cette réalité puisqu'au cours de l'étude, 58% des producteurs n'ont pas changé de classe de lait (basé sur les caractéristiques de la microflore) tout au long de l'année.

Bien que le souci premier soit basé sur la qualité sanitaire du lait, on observe une prise de conscience de l'existence et de l'importance des flores des laits cru (Berodier, Parguel, Convert 2013). Ainsi, certains ODG¹⁰ interdisent l'utilisation des produits comme les pré-trempages désinfectants lors de la préparation de la mamelle.

En s'appuyant sur des enquêtes, on peut définir des classes de producteurs en se basant sur leur pratiques de traite et plus précisément en matière d'hygiène de traite. On sait que le nettoyage mécanique (laine de bois, nettoyage à sec avec du papier, lavettes humides sans savon) des trayons réduit d'un facteur 30 la charge microbienne. L'utilisation en plus d'un produit désinfectant (pré-trempepage ou pré-moussage désinfectant, lavette humide avec désinfectant) réduit d'un facteur 100 la charge microbienne sur les trayons (Laithier et al. 2011). Les producteurs qui ont les pratiques d'hygiènes de traite les plus poussées (désinfection des trayons de manière individuelle, avec une lavette ou du pré-trempepage, présence systématique de post-trempepage et lavage de la machine à traire bi-journalier) ont des niveaux de microflore plutôt faibles. Au contraire, les éleveurs présentant des préparations des trayons différentes (sans préparation, préparation à sec ou collective, pas toujours de post-trempepage et lavage de la machine à traire une fois par jour), ont des niveaux en flore totale plus importants sans avoir une augmentation des flores d'altérations (Michel, Hauwuy, Chamba 2006).

En effet, il a été montré que l'utilisation de pré-trempepage désinfectant, en comparaison à de la laine de bois par exemple, conduit à un niveau moins élevé en flore totale et plus particulièrement en flore gram positive et négative d'intérêt technologique et en flore d'affinage (Bouton et al. 2012).

L'utilisation du post-trempepage est plus controversée d'un point de vue des flores. Son utilisation est liée au temps nécessaire pour le sphincter du trayon à se fermer ainsi qu'à ses qualités cosmétiques permettant de graisser le trayon et d'éviter les gerçures, les crevasses... Ce produit est constitué la plupart du temps par des désinfectants et des substances cosmétiques.

Certaines études renseignent sur l'impact négatif de son utilisation sur les microflore d'intérêts technologiques du lait cru comme les *Staphylococcus* et les

¹⁰ Organisme de Défense et de Gestion

Corynebacterium (Mallet et al. 2013). D'autres montrent que le post-trempage iodé ou glycérolé entraîne une diminution des bactéries d'affinage au niveau des trayons ; aucune modification n'est a priori observé dans le lait (Verdier-Metz et al. 2014).

Pour d'autres enfin, aucune modification ne serait réellement mise en évidence. De plus, le côté cosmétique de ce produit permet d'entretenir l'intégrité du trayon ; cela permet de se prémunir de la présence de bactéries pathogènes (Laithier et al. 2011).

Certaines pratiques d'élevages se révèlent être des pratiques influençant les microflores des laits crus.

L'alimentation est un des facteurs complexes influençant les équilibres microbiens (Fretin 2016). De manière synthétique, il a été montré que le foin a un effet positif sur les teneurs en Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et les bactéries propioniques dans le lait. L'enrichissement se ferait directement par contact du foin sur les trayons ou indirectement par la salive (Bouton et al. 2005). Au contraire de l'ensilage d'épis de maïs, qui entraîne une augmentation des flores d'altérations comme *Pseudomonas* et des niveaux en flore acidifiante plus faibles (Convert 2010). La promiscuité dans les bâtiments entravés ainsi que l'hygiène correcte de la salle de traite sont corrélées à une augmentation des flores d'intérêts comme les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, les bactéries propioniques et les Lactobacilles (Figure 4)

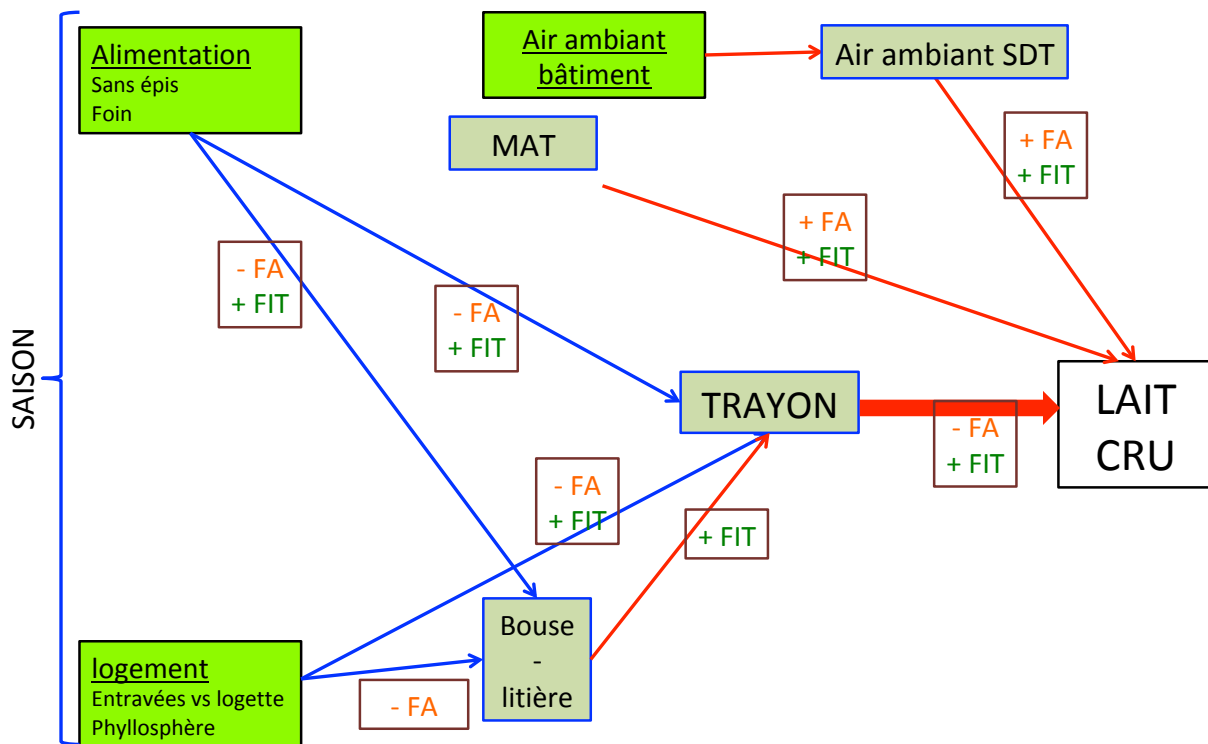


Figure 4 : Réservoirs principaux de la flore microbienne des laits crus et principaux flux de flore les reliant (FA : Flore d'altération; FIT : Flore d'intérêt technologique; SDT : Salle de traite, MAT : Machine à traire ; + effet positif sur le niveau de flore ; - effet négatif sur le niveau de flore)

Finalement, la réalisation de la traite dans de bonnes conditions (ambiance calme sans trop de bouses, aucune manipulation de fourrage, sans raclage ni paillage) ; ainsi qu'une bonne adaptation des pratiques d'hygiène, permettent de préserver les flores de l'environnement et d'obtenir des laits plus riches en flores d'intérêt technologique (Bouton et al. 2005).

Il est extrêmement difficile et dangereux de généraliser des recommandations sur les pratiques d'élevages permettant d'obtenir des laits de bonne qualité sanitaire et technologique. Il faut sans cesse s'adapter à l'élevage auquel on s'intéresse ; aucun élevage n'est identique. Des adaptations au cours des saisons, selon des événements marquants, pourraient même être envisagées à l'échelle d'une exploitation.

2 L'AJOUT DE LEVURES VIVANTES : OBJECTIF D'UTILISATION, MECANISMES D'ACTION DANS LE RUMEN

La société pousse vers l'intensification de la production à tous les niveaux. Cela se concrétise par une rationalisation des filières et une augmentation de l'efficacité de production. L'agriculture n'est pas en reste. Depuis la fin de la deuxième guerre mondiale, l'agriculture se rationalise.

Bien que les filières de valorisations IGP et AOP aient longtemps été épargnées, il n'échappe à personne que la productivité de ces filières a augmenté, à l'image de beaucoup d'autres activités économiques. Cela se constate au niveau de l'augmentation de la taille des troupeaux, l'augmentation de la productivité par vache. Bien que les rations soient principalement basées sur un fourrage de type foin, l'apport de concentrés est bien présent.

Ces propos peuvent être nuancés. En effet, certains cahiers des charges limitent la production laitière par vache, la quantité de concentrés distribués, les produits d'hygiène de traite (pré-trempeage interdit par exemple) ou encore la quantité de fourrages importés hors zone. Pour autant, on observe une forme d'intensification au sein de ces zones ; les agriculteurs gardent en effet plus de vaches l'hiver sans pour autant faire plus de foin ; en 2016, à la coopérative laitière de Beaufort, le volume de la production d'hiver a atteint le même niveau que le volume de la production d'été, ce qui n'était jamais arrivé depuis la création de la coopérative dans les années 1950.

Ainsi, il n'est pas étonnant de voir apparaître dans les systèmes de production des auxiliaires alimentaires à effet nutritionnel et zootechnique. Ces produits sont réglementairement considérés soit comme des matières premières, soit comme des additifs.

Les matières premières sont définies comme « des produits d'origine végétale ou animale dont l'objectif principal est de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux, à l'état naturel, frais ou conservés et des dérivés de leur transformation industrielle, ainsi que les substances organiques ou inorganiques [...] » (Règlement (CE) N°767/2009, 2009). Les Additifs sont définis comme des « substances, micro-organismes ou préparations, délibérément ajoutés aux aliments ou à l'eau pour

remplir notamment une ou plusieurs des fonctions suivantes : avoir un effet positif sur les caractéristiques des aliments pour animaux ; avoir un effet positif sur les caractéristiques des produits d'origine animale ; répondre aux besoins nutritionnels des animaux ; avoir un effet positif sur la production, le rendement ou le bien-être des animaux [...]» (Règlement (CE) N°1831/2003, 2003). Ces derniers sont additionnés à des fins technologiques, sensorielles ou nutritionnelles dans l'alimentation des vaches laitières.

Les auxiliaires alimentaires les plus utilisés sont le monopropylène glycol, les acides aminés et les micro-organismes comme les levures vivantes (Clignac 2016).

Les levures mortes ou inactivées sont les formes les plus fréquentes d'utilisation et sont considérées sous cette forme comme une matière première, au contraire des levures vivantes considérées comme des additifs et retrouvées de plus en plus dans les rations.

2.1 Pourquoi utiliser des levures vivantes ?

Les vaches laitières intégrées à des systèmes de productions intensifs sont souvent en situation de déséquilibre si la ration n'est pas adaptée. La maladie sous-jacente est l'acidose, très fréquente en élevage notamment lors de transition alimentaire (au moment de la mise bas, de la mise à l'herbe...).

Les levures vivantes sont mises en avant aujourd'hui pour diminuer les risques d'acidose et augmenter la production laitière. En pratique, les éleveurs des Savoie ne sont pas toujours au courant qu'ils intègrent des levures vivantes dans l'alimentation de leurs vaches. En effet, lors de l'étude réalisée en 2016 par Clignac, toutes les compositions des intrants alimentaires ont été vérifiées ; il en ressort que les agriculteurs achetant des aliments conformes aux CDC, ne sont pas informés par les vendeurs d'aliments que des levures vivantes sont présentes dans la composition.

Quand ils utilisent volontairement cet additif, c'est dans l'objectif de conserver l'équilibre ruminal des vaches pendant les périodes à risque (Clignac 2016).

L'impact des levures vivantes sur la production laitière est corroboré par de nombreuses études bien que d'autres nuancent cet effet positif.

Que ce soit pour les vaches, les brebis ou les chèvres, les levures vivantes ont un impact positif sur la production laitière (Chiofalo et al. 2007 ; Le Scouarnec et

al. 2006 ; Ali Haimoud-Lekhal, Chevaux, Piron 2016). Plus largement, l'utilisation de cet additif a un impact positif sur les performances zootechniques d'animaux à l'engraissement ou en croissance comme des agneaux ou des taurillons (Loncke et al. 2012 ; Bijja, Ducourtieux, Julien 2014 ; Kamal et al. 2013).

On peut donc constater que les performances zootechniques sont améliorées pour des animaux en situation de déséquilibre alimentaire comme le montre la méta-analyse de Desnoyers et al. (2009). Les animaux à l'engraissement sont à fort risque d'acidose ainsi que les vaches laitières nourries avec des rations à risque acidogènes à base d'ensilage de maïs ou contenant des fortes quantités d'aliments énergétiques concentrés. Les vaches, nourries à base de ration à dominante fourragère faiblement acidogène, répondent moins à l'ajout de levure vivante. De même, lorsque la ration présente un niveau insuffisant de protéines, les levures ont un impact positif sur la production. Ceci s'explique par une augmentation de synthèse de protéines par le microbiote ruminal. Ce n'est pas le cas lorsque la ration est équilibrée (Chiquette 2010).

Concernant la qualité du lait en nutriments, plusieurs études tendent à évaluer l'impact des levures vivantes sur les taux butyreux et protéique.

Le taux butyreux tend à augmenter (Chiofalo et al. 2007) alors que d'autres recherches sont plus prudentes quant à l'impact réel de la levure (Ali Haimoud-Lekhal, Chevaux 2003 ; Ali Haimoud-Lekhal, Chevaux, Piron 2016). Le taux protéique quant à lui n'est jamais affecté de manière significative.

L'importance de la microflore des laits crus sur la fromageabilité des laits et sur les caractéristiques organoleptiques des fromages a été établie (Bouton 2001 ; Bouton, Grappin 1995 ; Buchin, Beuvier 2000 ; Beuvier et al. 1997). La levure vivante la plus couramment utilisée est *Saccharomyces cerevisiae* ; cette levure fait partie de la flore fongique naturelle du lait cru et à un rôle important lors de l'affinage (Bouton 2014).

Face à l'augmentation de son utilisation dans les filières laits crus, la question de son impact sur la flore des laits est donc légitime. En effet, pour être autorisés dans les filières savoyardes, les additifs doivent avoir un impact zootechnique positif, ne pas altérer la composition du lait et renvoyer une image positive aux consommateurs.

Cette question est l'intérêt central de cette étude, étant donné que seules quelques publications ont été effectuées sur le sujet. A priori, la levure n'est pas

retrouvée dans le lait et aucune modification de la flore microbienne des laits cru n'a jusqu'ici été mesurée (Grilli et al. 2016 ; Deneufbourg, Tormo 2013).

Les études, précédentes réalisées sur le sujet, présentaient un effectif d'exploitations plus faible que celui de cette étude. Par ailleurs, nous avons prélevé plus de support et de réservoir potentiel de flore, afin de contrôler l'impact des levures vivantes sur l'équilibre microbien des différents réservoirs potentiels de la flore des laits crus. Enfin, les avancées technologiques permettent aujourd'hui d'utiliser de manière courante les outils de métagénomique. Les analyses réalisées pour caractériser l'évolution de la microflore sont basées ici sur la méthode de métabarcoding.

2.2 Quels sont les mécanismes sous-jacents ?

2.2.1 Microflore du rumen, mécanisme d'acidose et utilisation de levures vivantes

Le rumen contient une population microbienne importante, parfois qualifiée de second génome des ruminants. Cette population est composée entre autres de bactéries (10^{11} cellules/mL), de protozoaires (10^5 cellules/mL) et de champignons (10^3 cellules/mL).

De manière synthétique, les fibres et l'amidon présents dans le rumen sont hydrolysés en oses. Ces derniers sont fermentés en AGV¹¹ (acétate, butyrate ou propionate) et en gaz (CO₂ ou CH₄) (Figure 5). La production de lactate est normalement très faible.

¹¹ Acides Gras Volatils

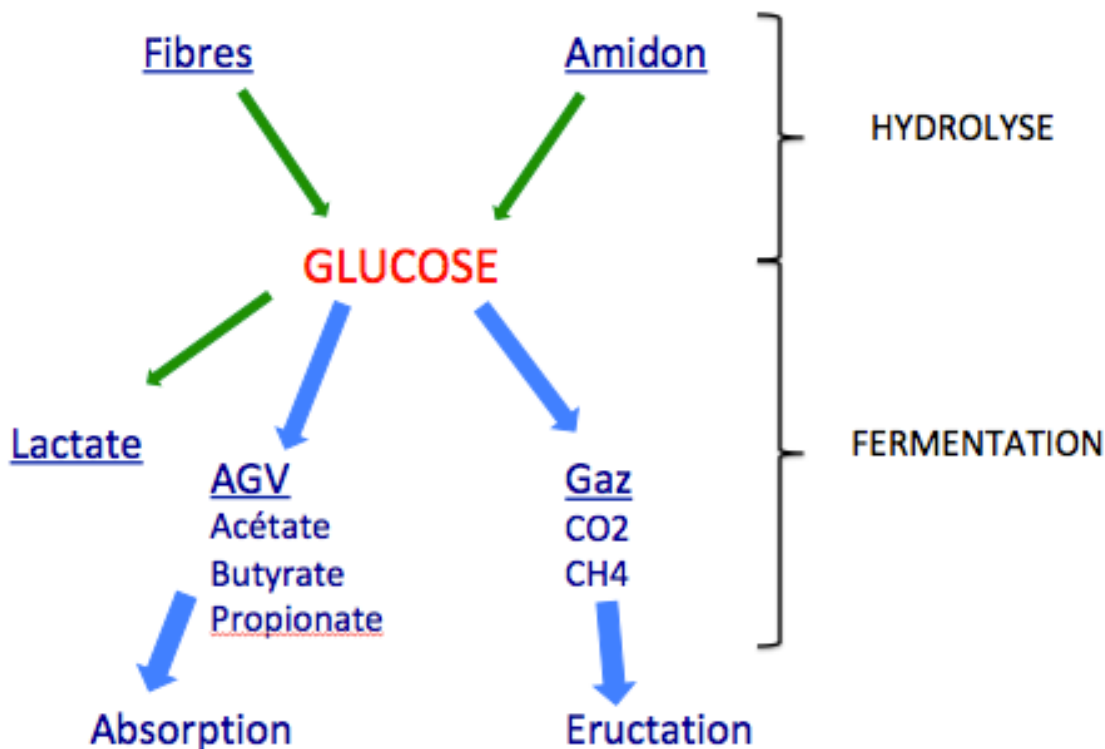


Figure 5 : Dégradation de carbone Rumen (d'après Chiquette et al. 2010)

Une ration riche en concentrés, eux-mêmes riches en glucides rapidement fermentescibles, entraîne une accumulation d'AGV et de lactate. Cela entraîne une baisse du pH ruminal. Si le pH s'abaisse en dessous de 6, l'activité des bactéries cellulolytiques est réduite et au dessous de 5,5 le nombre de protozoaires diminue, au contraire des bactéries utilisatrices (exemple *M. elsdenii*) ou produisant du lactate, qui elles, voient leur population augmenter (exemple *Streptococcus bovis*). Aussi longtemps que la production de lactate se maintient au même niveau que son utilisation, le ruminant est en situation d'acidose.

Si en revanche, le pH diminue encore, les lactobacilles prennent le dessus et provoquent une augmentation encore plus forte de lactate ; le pH passe alors sous la valeur de 5,2 et les bactéries utilisant le lactate disparaissent. On est alors en situation d'acidose aiguë.

Des études ont montré que l'utilisation de levures vivantes (*Saccharomyces cerevisiae*) permet de limiter les effets néfastes de l'acidose.

Lors de situation d'acidose, la supplémentation en levures vivantes permet globalement d'observer moins longtemps un pH ruminal en dessous de 5,2 à la suite de l'ingestion de la ration. De plus, le pH moyen et minimal est globalement plus

élevé (Brossard et al. 2004 ; Desnoyers et al. 2006 ; Giger-Reverdin et al. 2004 ; Michalet-Doreau, Morand 1997 ; Chiquette 2009).

Les levures vivantes agissent également sur le potentiel d'oxydo-réduction du rumen. Une méta-analyse regroupant 54 traitements a montré que *Saccharomyces cerevisiae* renforce les conditions réductrices du rumen (Huang et al. 2016).

Ce microenvironnement anaérobie stimule l'activité des bactéries cellulolytiques et leur fixation aux particules de fibres, ce qui augmente la vitesse de digestion. Une pression partielle en dioxygène basse active la production de propionate à partir du lactate. Cela a pour conséquence d'augmenter le pH ruminal et de diminuer l'acidose (Figure 6) (Chiquette 2010).

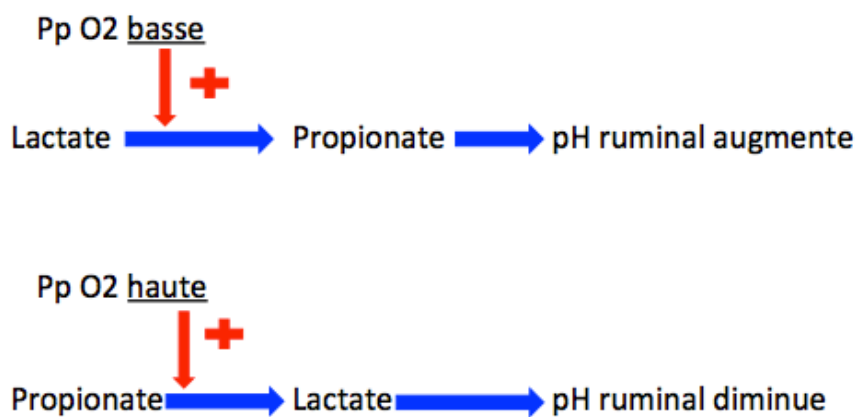


Figure 6 : Anaérobiose et équilibre lactate / propionate dans le rumen (d'après Chiquette et al. 2010)

Des études nuancent l'effet de *Saccharomyces cerevisiae* sur les conditions ruminales et sur les performances zootechniques (Hasunuma et al. 2016 ; Kamal et al. 2013). Les conclusions des études précédentes sont donc à considérer avec prudence, des conditions bien précises devant sûrement être nécessaires pour que les levures soient utiles (Huang et al. 2016).

La digestion ruminale est dépendante de la présence et du fonctionnement de la microflore ruminale. L'apport d'une flore exogène n'est pas neutre quant au fonctionnement de la flore indigène.

L'impact des levures vivantes sur la structure et la diversité de la population bactérienne du rumen a entre autres été étudié par AlZahal et al 2017. Il a été montré qu'en comparaison de la ration, l'apport de levures vivantes a un très faible impact sur la structure et la diversité de la microflore ruminale. L'apport de levures tend à augmenter l'abondance de certains OTUs¹² anaérobies dominants comme *F. succinogenes* et le phylum SR1 (AlZahal et al. 2017). En se basant sur le séquençage d'ARN 16S, il est possible de montrer que les levures vivantes augmentent l'abondance spécifique de micro-organismes ayant des enzymes fibrolytiques.

En se basant sur une ration riche en fibres, l'ajout de levures vivantes a différents effets sur la population de champignons. L'abondance relative de *Lewia* et de *Neocallimatis* spp. est augmentée, tandis que, *Alternaria*, *Candida*, *Orpinomyces* et *Piromyces* spp. ont une abondance relative diminuée (Ishaq et al. 2017). Globalement, on la diversité alpha et le nombre d'OTU sont augmentés par l'apport de levures, que ce soit avec une ration riche en fibres ou riche en glucides fermentescibles. Les levures vivantes orientent la microflore du rumen vers une augmentation des activités cellulolytiques.

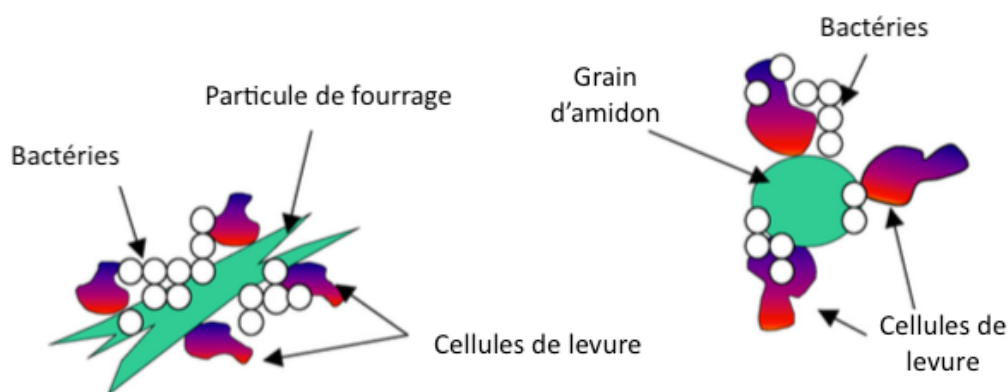
¹² Operationnal Taxonomic Unit

2.2.2 Hypothèse du maintien du pH ruminal, l'action des levures vivantes sur la multiplication microbienne

Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer le maintien du pH ruminal lors de l'ajout de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières. Les levures pourraient favoriser la multiplication bactérienne et non la production d'AGV. Ceci a été modélisé par Jouany (Jouany 2006).

L'apport de levures doit être renouvelé tous les jours dans l'alimentation. La levure est un micro-organisme aérobique qui oxyde en présence de dioxygène. En revanche en milieu anaérobique, elle peut fermenter des oses. Or, autour des particules solides présentes, quelques molécules d'oxygènes sont retrouvées. Après ingestion, les levures vivantes se retrouvent donc principalement attachées par une matrice à ces particules solides. A l'opposé, on les trouve faiblement présentes dans le jus ruminal.

En utilisant le dioxygène autour des particules, les levures créent un environnement anaérobique propice au développement des bactéries cellulolytiques anaérobies et à leur attachement aux fibres composés de celluloses. *Saccharomyces cerevisiae* métabolise des sucres et des petits oligosaccharides solubles présents dans l'alimentation de la vache ou produits par les bactéries amylolytiques attachées aux grains d'amidons ; ce métabolisme produit alors du CO₂. Les levures produisent également de l'éthanol, du glycérol, des peptides et des acides aminés. Ces substrats sont utilisés par d'autres bactéries. Par exemple, *M. elsdenii* utilise des acides aminés fournis par le métabolisme des levures afin d'utiliser du L-lactate. Associés aux levures, ces micro-organismes forment des microenvironnements particuliers nommés « micro-consortium » (Figure 7) (Jouany 2006).



[Figure 7 : Modèle de l'interaction des cellules de levure avec les bactéries du rumen, proposé par Jouany \(2006\).](#)

Il a été également confirmé in-vivo, que l'utilisation de levures vivantes diminue le potentiel redox du rumen et protège par ce fait le caractère anaérobie strict de ce milieu. L'utilisation de dioxygène est d'autant plus essentielle au bon fonctionnement du rumen que le potentiel redox est le facteur limitant de l'activité cellulolytique des bactéries du rumen (Huang et al. 2016). Il y a une grande diversité entre souches de *Saccharomyces cerevisiae* en ce qui concerne leur capacité à capter le dioxygène ; cela est strictement lié à leur capacité de stimulation des bactéries et de leur effet global au niveau du rumen.

Par ailleurs, les levures vivantes accumulent du malate intracellulaire ; en le relarguant au niveau des micro-consortiums (particules solides + levures + bactéries), elles stimulent l'utilisation d'acide lactique par *Streptococcus ruminantium* par exemple. In vitro, *Saccharomyces cerevisiae* entre en compétition avec *Streptococcus bovis*, producteur de lactate, pour l'utilisation de glucose. En condition anaérobie, les levures s'imposent, ce qui entraîne une diminution de la production de lactate (Chaucheyras et al. 1996).

Enfin, lors de la lyse des levures, il y a libération de protéines, d'acides aminés et de vitamine issue du cytosol ; mais aussi des B-D-glucane et mannoprotéine constituants de la paroi des levures. Ces composés sont donc utilisés par différentes bactéries pour leur métabolisme ou leur développement.

Ce modèle, permet de mieux cerner où se localisent les levures dans le rumen et comment pourraient être expliquées leurs actions positives sur l'acidose (Figure 8).

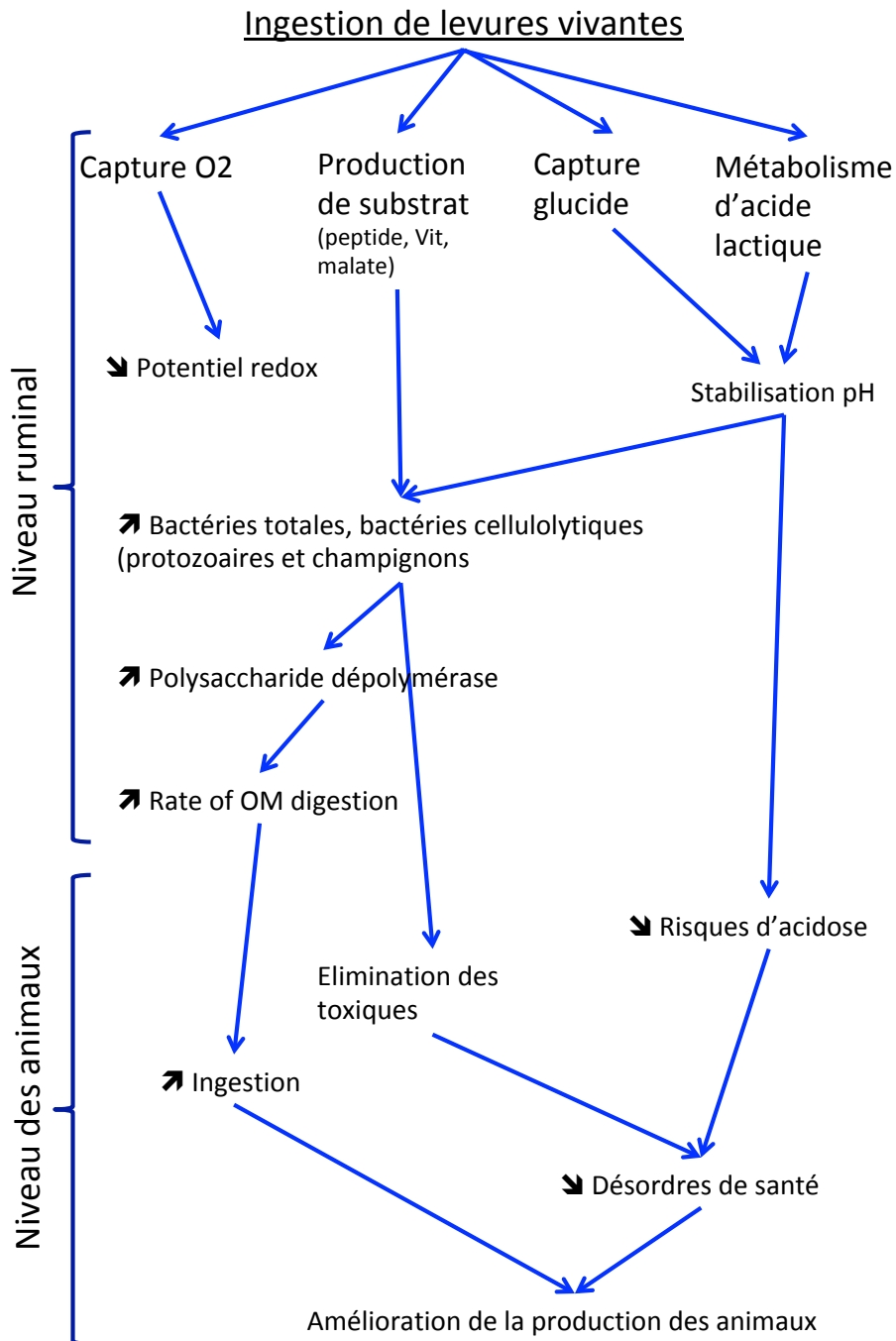


Figure 8 : Modélisation de l'action des levures vivantes, proposé par Jouany (2006)

3 Problématique de l'étude

Les levures vivantes, dont *Saccharomyces cerevisiae*, font parties de la flore naturelle des laits crus. Leur rôle est essentiel lors de l'affinage des fromages ; que ce soit en produisant directement des composés aromatiques ou en facilitant l'action de certaines bactéries lactiques. De nombreuses interactions entre les levures et le reste de la microflore ont lieu lors de la transformation du lait et au cours de l'affinage du fromage. Ces interactions structurent et caractérisent la communauté microbienne du lait cru d'abord et du fromage ensuite. Les levures restent présentes et actives jusqu'à la fin de l'affinage. Bien que présentes dans les laits crus, la source d'ensemencement principal de levure est la saumure. Elles n'interviennent donc en grand nombre qu'après la transformation du lait cru.

L'utilisation de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières a un intérêt exclusivement zootechnique. Il a été montré qu'en situation de déséquilibre, les levures aident à rééquilibrer le rumen pour permettent l'expression du potentiel de production (Poppy et al. 2012).

En filière fromagère au lait cru AOP et IGP, les levures vivantes ne sont pas inscrites sur la liste positive des différents CDC (ANNEXE 1 : les Cahiers des charges et les levures vivantes). Leur utilisation est donc officiellement interdite. Une étude réalisée en 2016, met pourtant en évidence une utilisation de cet additif, ceci au détriment du respect des CDC (Clignac 2016).

On sait que la flore des laits crus est un lien fort qui unit les fromages des Savoie à leur terroir. Cette flore résulte d'ensemencements successifs du lait depuis sa sortie de la mamelle jusqu'à sa collecte ; chaque exploitation agricole présente une flore de lait particulière.

Ne connaissant pas l'impact des levures sur les différents réservoirs de flore des laits crus de l'environnement, il est légitime de s'interroger sur le devenir de ce micro-organisme dans l'environnement de l'exploitation agricole et de son impact sur l'équilibre des flores préexistantes.

4 Hypothèses de recherche et objectifs

Le devenir, dans l'environnement de la ferme, des levures vivantes ajoutées dans l'alimentation des vaches laitières a fait l'objet de très peu d'études. *Saccharomyces cerevisiae* quand elle est ingérée n'est pas retrouvée dans le lait cru et la microflore du lait cru n'est pas modifiée de manière significative (Grilli et al. 2016 ; Deneufbourg, Tormo 2013). Cependant, la flore des laits crus résulte de nombreux ensemencements et ce par des réservoirs différents. Bien que le trayon soit considéré comme le réservoir principal de la flore des laits ; il ne faut pas négliger l'importance de réservoirs plus secondaires comme la machine à traire et l'air de la salle de traite. De nombreux facteurs influencent ces réservoirs et les rendent uniques selon les saisons, les pratiques d'élevages et l'alimentation.

L'objectif de ce travail est donc dans un premier temps de suivre la levure dans l'environnement de la ferme et plus particulièrement dans les principaux réservoirs de flore des laits, lors de l'ajout de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières.

Dans un deuxième temps, l'objectif est de mesurer l'impact des levures vivantes sur la dynamique des principaux réservoirs de flore des laits crus et sur la microflore du lait cru.

Afin de répondre à ce questionnement, nous nous attacherons à répondre aux deux questions suivantes :

1. Suite à l'ingestion de levures vivantes, où retrouve-t-on ces levures précisément ? A quel niveau dans l'exploitation ?
2. L'ajout de levures vivantes dans la ration a-t-elle un impact sur l'équilibre des flores microbiennes du lait cru et des principaux réservoirs de flores du lait cru ?

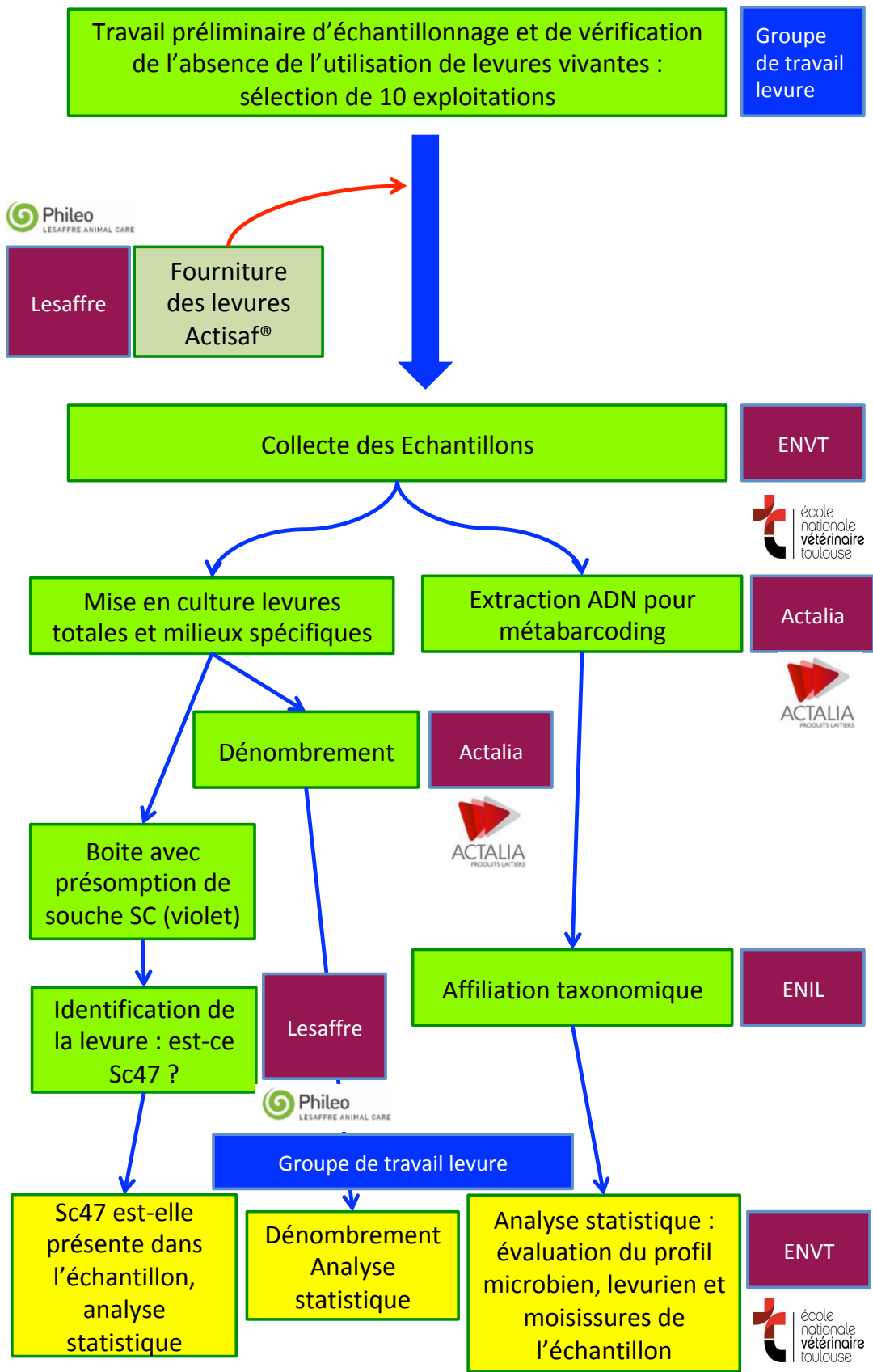


Figure 9 : Diagramme d'intervention des acteurs du projet. Groupe de travail composé de l'AFTALP, du CERAQ, du GTV, de EDS, d'une stagiaire ENVT, d'ACTALIA et de Phileo Lesaffre

5 STRATEGIE ET MOYENS MIS EN OEUVRE

5.1 Dispositif expérimental et choix des supports de prélèvement

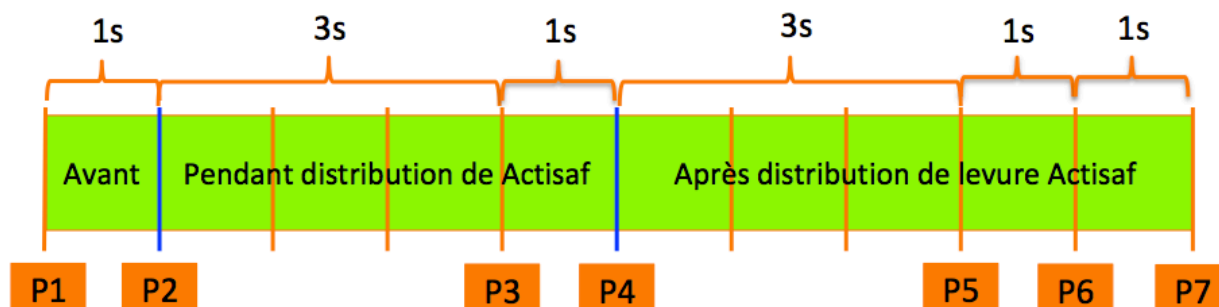


Figure 10 : Protocole mis en place afin de répondre aux questions posées. Px : Prélèvement x, 1s : 1 semaine.

Le protocole (Figure 10) mis en place pendant l'hiver 2018, a été possible grâce à l'implication de différents intervenants (Figure 9).

Afin de s'affranchir au maximum du facteur alimentation, qui a un rôle non négligeable sur la qualité du lait et la flore des laits, le protocole s'est déroulé du 1^{er} janvier à fin avril. L'alimentation des vaches était considérée comme stable au cours de cette période. Les vaches étaient en bâtiment ; même s'il y a des modifications de fourrages distribués, il n'y a pas eu de grand changement alimentaire du type : fourrage conservé-pâturage.

Les éleveurs ont distribué 100g de prémix expérimental par vache et par jour, ce qui correspond à 5 g par vache et par jour de *Saccharomyces cerevisiae* Sc47-CNCM I-4407, Actisaf®, 10^{10} ufc/g MS (Phileo Lesaffre Animal Care, France).

L'objectif de ce dispositif est tout d'abord de faire un état des lieux des différentes flores présentes dans l'environnement de la ferme et dans les réservoirs de flore des laits crus. Cela est permis par la réalisation de prélèvements (prélèvement 1 et 2) lors de la période nommée « Avant ».

Ensuite, l'objectif de l'étude est de mesurer l'impact de levures vivantes ingérées sur l'écosystème de différents supports et réservoirs de flore. Ainsi, par la suite deux périodes ont été distinguées selon que les levures vivantes Actisaf® étaient distribuées ou non dans l'alimentation.

La période « pendant distribution » correspond à une période de 4 à 5 semaines, pendant laquelle les éleveurs incorporaient les levures Actisaf® dans l'alimentation. Les prélèvements commencent toujours 3 semaines après le changement alimentaire (ajout ou retrait des levures vivantes), délai habituel pour considérer que le microbiote du rumen s'est adapté au régime alimentaire. Les prélèvements pendant (prélèvements 3 et 4) avaient pour objectif de détecter la présence éventuelle de levures dans l'environnement et plus spécifiquement dans les réservoirs de flore des laits, l'objectif final étant de mettre en évidence ou non une modification de l'équilibre des flores du lait cru et de ces principaux réservoirs.

Enfin, les prélèvements « après distribution » étaient réalisés 3 semaines après l'arrêt de la distribution des levures vivantes Actisaf® (prélèvements 5, 6 et 7). Ces prélèvements permettaient de suivre la rémanence de la levure (si elle était détectée pendant la distribution) et la résilience des flores du lait et de ses réservoirs (Figure 10).

Différents supports ont donc été prélevés pendant chacun de ces prélèvements. Il a été décidé que les supports prélevés seraient :

- le lait de mélange
- le trayon avant préparation à la traite
- l'air du bâtiment
- la bouse intra-rectale

Pour des raisons de praticité et d'optimisation du temps imparti, les prélèvements ont été réalisés pendant la traite dans les différentes exploitations ; soit toujours le matin, soit toujours le soir. Les échantillons étaient stockés dans une glacière à midi (soit le prélèvement de la veille au soir et celui du matin même).

5.2 Echantillonnage

L'objectif de l'étude est de voir globalement, à l'échelle de tous les AOP et IGP confondus, quel est l'impact de la levure sur la microflore. Les disparités de pratiques d'élevages sont grandes entre un paysan de montagne type Beaufort et un paysan de l'Albanais en IGP. L'alimentation est différente, ainsi que les races de vaches utilisées, le niveau de production, le logement ou encore les techniques de traite.

L'étude se veut représenter tous les AOP et IGP ; ce qui permet d'avoir représenté l'ensemble des types d'alimentations, de logements, de races et de techniques de traites des Savoie.

Ainsi, il a été choisi de sélectionner :

- 2 exploitations en AOP Beaufort (foin)
- 1 exploitation en AOP Abondance (foin)
- 2 exploitations AOP Reblochon (foin)
- 5 exploitations en IGP Emmental et Tomme de Savoie (foin + maïs épis ou foin exclusif)

Parmi les différentes exploitations des IGP et AOP adhérant au contrôle laitier, il a été sélectionné les exploitations ayant les plus fortes productions. Une liste de dix exploitations est ainsi obtenue (ANNEXE 3 : Complément d'information concernant les exploitations sélectionnées et leurs pratiques).

Avant la mise en place du dispositif, une visite des exploitations a été faite pour vérifier la non distribution de levure au moins trois mois avant le démarrage de l'étude, ainsi que l'absence de stabilisateur microbien de litière. Les deux exploitations concernées ont cessé ces pratiques fin septembre 2017.

Nous avons donc l'assurance qu'aucune des exploitations participant au protocole, ne distribuait des levures au moins 3 mois avant le début de l'étude et surtout pas pendant la phase de prélèvements préliminaires (prélèvement 1 et 2).

5.2.1 Le support trayon

Le trayon est considéré comme le réservoir principal de la flore des laits crus (Mallet et al. 2013). Un prélèvement de la flore présente sur le trayon avant préparation a été réalisé pendant la traite. Pour cela, 10 vaches ont été prélevées à intervalle régulier lors de la traite : une chiffonnette stérile par diagonale de trayon a été utilisée, préalablement humidifiée avec 10mL de solution de TS+tween, soit un total de 2 chiffonnettes par vache.

Les chiffonnettes ont été ensuite toutes stockées dans un sachet.

Les vaches en période de traitement antibiotique par voie intra-mammaire ou par voie général ont été évitées, de même que les vaches en post-partum n'ayant pas eu dans leur ration trois semaines minimum de levures vivantes Actisaf®.

5.2.2 Le support air

L'air de la salle de traite et donc du bâtiment sont considérés comme des réservoirs de flore des laits crus (Bouton et al. 2005 ; Mallet et al. 2013).

Il a donc été choisi d'échantillonner ce support de flore ; cela va permettre de voir l'impact de la distribution de la levure Actisaf® sur l'écosystème de ce support.

Pour cela, le Cyclone air sampler a été utilisé : Coriolis μ ® (Bertin tech, Fr). Cet appareil était placé à 5 points du bâtiment pour prélever l'air à un débit de 200L/min pendant 10 min (Photographie 1). Les points de prélèvements étaient toujours les mêmes dans le bâtiment (Photographie 2). En raison de difficultés de réalisation et de temps, il n'a pas été pris en compte le moment de distribution du fourrage par rapport au prélèvement d'air.



Photographie 1 : Prélèvement d'air grâce au Coriolis μ ®,
élevage 10



Photographie 2 : Prélèvement grâce au Coriolis en différents points du bâtiment

5.2.3 Le support bouse

Il est bon de se rappeler que la bouse est la résultante du travail de tout le système digestif, et non seulement celui du rumen.

Bien que la bouse ne soit pas une source d'ensemencement direct du trayon en flore d'intérêt (Joandele 2007), il est envisageable que de la bouse contamine directement la machine à traire et le lait.

De la bouse intra-rectale a donc été prélevée. Dix vaches ont été choisies au hasard après la traite. Les prélèvements étaient rassemblés dans un pot (mélange de bouse). Les vaches sous traitement antibiotique étaient évitées.

5.2.4 Le support lait de mélange

Le lait de mélange est spécifique d'une exploitation ; il est le reflet des pratiques d'élevages (alimentation, logement...) et de l'hygiène de traite.

Le lait est l'objet qui nous intéresse le plus dans cette étude. En effet, c'est la matière première utilisée pour faire le fromage. La richesse et la diversité de son écosystème sont indispensables pour avoir un produit fini typique et authentique, ancré dans un terroir précis.

L'analyse de la microflore du lait de mélange va nous permettre de voir dans un premier temps si des levures vivantes Actisaf® sont retrouvées dans le lait. Dans

un deuxième temps nous verrons comment est affectée la microflore du lait cru lors de l'ajout de levures vivantes Actisaf® dans l'alimentation des vaches.

Pour cela, du lait a été prélevé avec une louche flambée à l'alcool après la traite. Stocké dans un pot stérile de 100 ml, le lait a été conservé dans une glacière avant d'être déposé au laboratoire Actalia.

6 ANALYSES ET DONNÉES DISPONIBLES

6.1 Préparation des échantillons

Le travail de collecte des échantillons a été réalisé dans le cadre de la partie expérimentale de ma thèse d'exercice vétérinaire. Tous les échantillons étaient ensuite déposés à Actalia ; préparés, traités par leur soin.

Après réception, un travail de préparation des échantillons a été nécessaire afin de permettre ensuite l'utilisation des échantillons pour microbiologie et extraction d'ADN.

La totalité des échantillons (280 échantillons) a été remise en suspension dans un milieu tamponné adéquat avant homogénéisation. Puis, les échantillons ont subi des lavages successifs (centrifugation – remise en suspension dans un milieu taponné) pour supprimer un maximum d'agents inhibiteurs potentiels (comme la matière grasse du lait). Les échantillons (à l'exception des ambiances : air) ont été additionné d'un milieu glycérolé afin de permettre leur conservation après traitement.

6.2 Analyses microbiologiques

Après préparation spécifique des échantillons par Actalia, les suspensions d'échantillons ont été diluées en série et des dénombrements ont été réalisés.

Les dénombrements ont concerné les germes totaux, les levures, les moisissures et enfin les *Saccharomyces cerevisiae*.

Les dénombrements des *Saccharomyces cerevisiae* ont été réalisés en respectant la méthode fournie par Lesaffre suite à la réunion en visioconférence du 10 Novembre 2017.

La méthode était la suivante : réalisation de dilutions en séries (de 10 en 10), étalement sur milieu CHROMagar™ Candida, dénombrement des colonies de champignon. Les *Saccharomyces cerevisiae* dont la souche Sc47 commercialisée par Lesaffre (Actisaf®) ont un morphotype violet sur le milieu chromogène de culture.

Les dénombrements de *Saccharomyces cerevisiae* ont été réalisés sur l'ensemble des échantillons (280 échantillons), alors que les dénombrements de germes totaux et des levures et moisissures ont été réalisés uniquement une fois par

période (avant, pendant et après distribution) pour les quatre types d'échantillons pour les 10 exploitations.

6.3 Envoi des géloses à Philéo Lesaffre

Les géloses CHROMagarTM Candida contenant des colonies suspectes violettes ont été envoyées à la société Lesaffre. Ainsi, les géloses de 87 échantillons différents ont été envoyées afin d'identifier et de suivre la souche Sc47.

Cela a été permis en s'intéressant à une séquence spécifique aux levures : la région 26S. Par extraction d'ADN, amplification par PCR et comparaison de bases de données, Lesaffre nous a permis de savoir si la souche Sc47 ingérée était retrouvée sur différents supports de flore et dans le lait cru ou non.

6.4 Extraction d'ADN pour métagénomique

Actalia a fait subir à tous les échantillons une préparation interne permettant l'extraction d'ADN de la totalité des microorganismes présents. Cette étape est essentielle. En effet, une extraction incomplète pourrait créer des biais dans l'interprétation des résultats. La qualité et la quantité d'ADN extrait étaient contrôlées (électrophorèse et/ou Nanodrop). La concentration d'ADN de chacun des échantillons a été notée (ng/μl).

La construction des plaques pour la suite des opérations de métabarcoding (amplification, séquençage...) a été réalisée par Actalia.

6.5 Traitement bioinformatique des données de métagénomique

Suite à l'extraction de l'ADN et la réalisation des microplaques, les données ont été transmises à différents intervenants pour la suite des opérations. Ainsi, les microplaques ont été traitées par le LECA¹³ (étape d'amplification) qui les a transférées à la société FASTERIX pour le séquençage des amplifions. Les données brutes de séquençage ont été transférées à l'ENILV¹⁴ pour l'assignation taxonomique des séquences.

¹³ Laboratoire d'Ecologie d'Alpine

¹⁴ Ecole Nationale d'Industrie Laitière et des Viandes

Les données de dénombrement et d'identification de la souche Sc47 ont été traitées sur Rstudio (version 3.4.4.) grâce à une analyse de variance (ANOVA). Pour affiner et objectiver les différences entre les périodes, le test Tukey HSD a été effectué lorsque l'ANOVA révélait des différences significatives.

Les données de métagénomique ont été traitées par Rstudio version 3.4.4 grâce aux packages phyloseq et vegan.

Dans cette étude, la biodiversité est basée sur l'unité « taxon bactérien ». A chaque taxon correspond une séquence bien particulière au niveau des régions variables du génome. On s'intéresse donc aux OTUs afin de caractériser la biodiversité de ces écosystèmes.

La diversité alpha permet d'avoir une idée de la diversité d'un échantillon unique, elle permet de se focaliser sur une modification à petite échelle de la biodiversité (OTUs dominants, OTUs rares...). La biodiversité est caractérisée par deux éléments : la richesse et l'équitabilité.

La richesse est le nombre d'espèces présentes dans l'écosystème considéré, indépendamment de leur fréquence ou abondance. C'est la mesure qui donne le plus d'importance aux espèces rares, toutes les espèces présentes ont la même importance quelle que soit leur fréquence.

L'équitabilité est la régularité de la distribution des espèces. Une espèce abondante ou non n'apporte pas la même contribution à un écosystème (Marcon 2010).

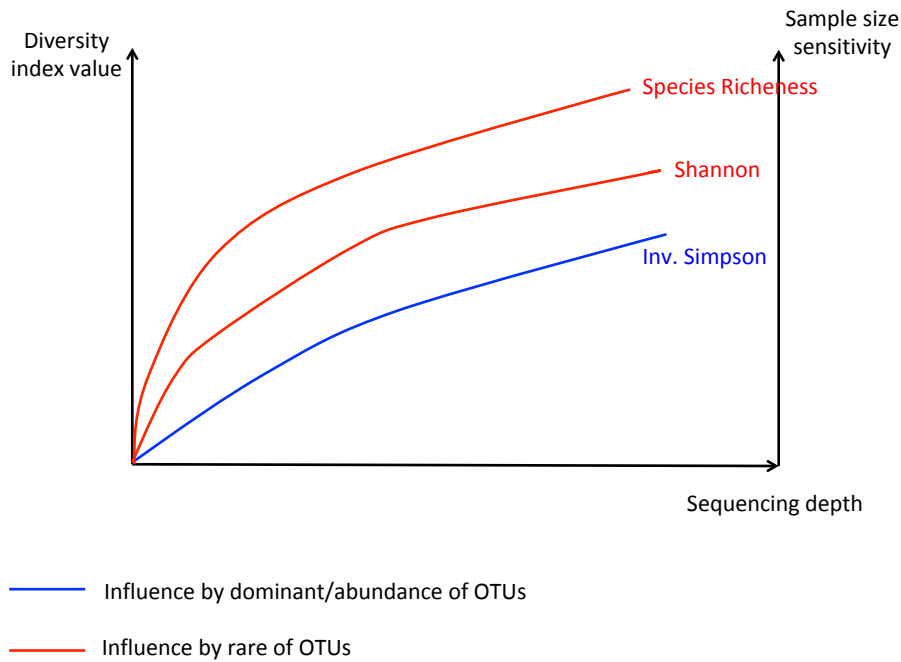
La diversité alpha est caractérisée ici par le nombre d'OTUs, l'indice de Chao1, l'indice de Shannon et l'inverse de Simpson (Graphique 1).

Le nombre d'OTUs est une mesure qualitative de la richesse de l'écosystème, calculé indépendamment de l'abondance relative.

L'indice de Chao1 est une estimation non paramétrique de la richesse minimale et basée sur le nombre d'OTUs rares. C'est une estimation du nombre réel d'espèces présentes à partir du nombre d'espèces observées.

L'indice de Shannon représente à la fois la richesse et l'équitabilité. Il donne la même importance à tous les individus mais est influencé par les OTUs rares.

L'inverse de Simpson est l'inverse de la probabilité de piocher au hasard deux bactéries appartenant au même OTU. Il est influencé par les OTUs dominants.



Graphique 1 : Evolution des indices de biodiversité selon la taille de l'échantillon et la précision du séquençage

L'impact de la période (avant, pendant ou après distribution) a été statistiquement évalué grâce à une ANOVA.

La diversité bêta représente la biodiversité d'un écosystème à une échelle très grande. On regarde la diversité dans sa globalité. Cette dernière a été objectivée grâce à une PERMANOVA sur une analyse multivariée (NMDS) et à une analyse LEfSe (LDA¹⁵ effect size) sur GALAXY (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy>).

Le seuil de signification a été considéré à partir de 5%, et les tendances entre 5 et 10%. Lorsque $P > 0,10$, l'effet était considéré comme non significatif.

¹⁵ Linear Discriminant Analysis

7 RESULTATS DE L'ÉTUDE

7.1 Retrouve-t-on des levures vivantes Sc47 ? Sur quel(s) support(s) ?

7.1.1 Résultats des dénombrements

Le dénombrement sur gélose spécifique nous permet d'évaluer l'impact de la distribution de levures vivantes sur la teneur certain micro-organisme (germes totaux GT, levures dont *Saccharomyces cerevisiae* SC, moisissures).

7.1.1.1 Germes totaux

La distribution de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières n'a aucun impact sur le niveau de germes totaux des supports prélevés (trayon, lait, air et bouse) (Tableau 1).

On remarque que le niveau de germes moyen dans le lait est très bas (médiane à 1000 ufc/mL).

Tableau 1 Impact de la période sur le dénombrement des Germes totaux (GT) pour tous les supports prélevés. Résultat de l'analyse de variance, seuil de significativité, p-value < 0,05

| SUPPORT | PERIODE | | | | | | ANOVA |
|---------|---------------|------|---------------|------|---------------|------|-------|
| | AV | | PT | | AP | | |
| | Moyenne (log) | SD | Moyenne (log) | SD | Moyenne (log) | SD | |
| AIR | 4,48 | 0,48 | 4,483 | 0,69 | 4,53 | 0,56 | NS |
| BOUSE | 6,579 | 0,55 | 6,618 | 0,33 | 6,86 | 0,51 | NS |
| TRAYON | 7,52 | 0,73 | 7,323 | 0,73 | 7,29 | 0,63 | NS |
| LAIT | 3,212 | 0,72 | 3,227 | 0,51 | 3,317 | 0,43 | NS |

7.1.1.2 Moisissures

Seul le niveau en moisissure de l'air est affecté de manière significative ($p = 0,0007$) par la distribution de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières : le niveau de moisissures augmente entre la période « avant » et « après ». Ainsi, la situation « avant » est différente de « après » de manière significative (Tableau 2), le niveau de moisissures augmente tout au long de l'étude.

Tableau 2: Impact de la période sur le dénombrement des moisissures pour tous les supports. Résultat de l'analyse de variance et du test de Tukey HSD, seuil de significativité p -value < 0,05 (av : avant, pt : pendant, ap : après).

| SUPPORT | PERIODE | | | | | | ANOVA | TukeyHSD |
|---------|--------------------|------|---------------|------|-------------------|------|--------------------|--------------|
| | AV | | PT | | AP | | | |
| | Moyenne (log) | SD | Moyenne (log) | SD | Moyenne (log) | SD | | |
| AIR | 2,363 ^a | 0,91 | 2,692 | 0,96 | 3,44 ^b | 0,69 | p -value < 0,001 | av-ap : 0,02 |
| BOUSE | 2,194 | 1,44 | 2,546 | 0,71 | 2,656 | 0,46 | NS | |
| TRAYON | 2,567 | 0,97 | 2,695 | 1,01 | 2,456 | 1,01 | NS | |
| LAIT | 0,24 | 0,39 | 0,234 | 0,74 | 0,36 | 0,77 | NS | |

7.1.1.3 Levures

Seul le niveau en levure de la bouse est affecté de manière significative par la distribution de levures vivantes ($p = 0,005$). On a donc une situation « pendant » qui est différente de « avant » et « après » (Tableau 3) : le niveau de levures est plus élevé lors de la période « pendant » par rapport aux périodes « avant » et « après ».

Tableau 3: Impact de la période de distribution sur le dénombrement des levures pour tous les supports.
Résultat de l'analyse de variance, seuil de significativité p -value < 0,05

| SUPPORT | PERIODE | | | | | | ANOVA | TukeyHSD |
|---------|-------------------|------|--------------------|------|--------------------|------|----------------|------------------------------|
| | AV | | PT | | AP | | | |
| | moyenne (log) | SD | moyenne (log) | SD | moyenne (log) | SD | | |
| AIR | 1,829 | 0,86 | 1,696 | 1,23 | 2,525 | 1,28 | NS | |
| BOUSE | 1,47 ^a | 1,19 | 3,167 ^b | 0,86 | 1,631 ^a | 1,23 | p-value < 0,01 | pt-ap : 0,01 ; pt-av : 0,005 |
| TRAYON | 3,284 | 1,23 | 2,863 | 1 | 2,495 | 1,39 | NS | |
| LAIT | 0,998 | 0,98 | 0,947 | 1,13 | 0,63 | 0,87 | NS | |

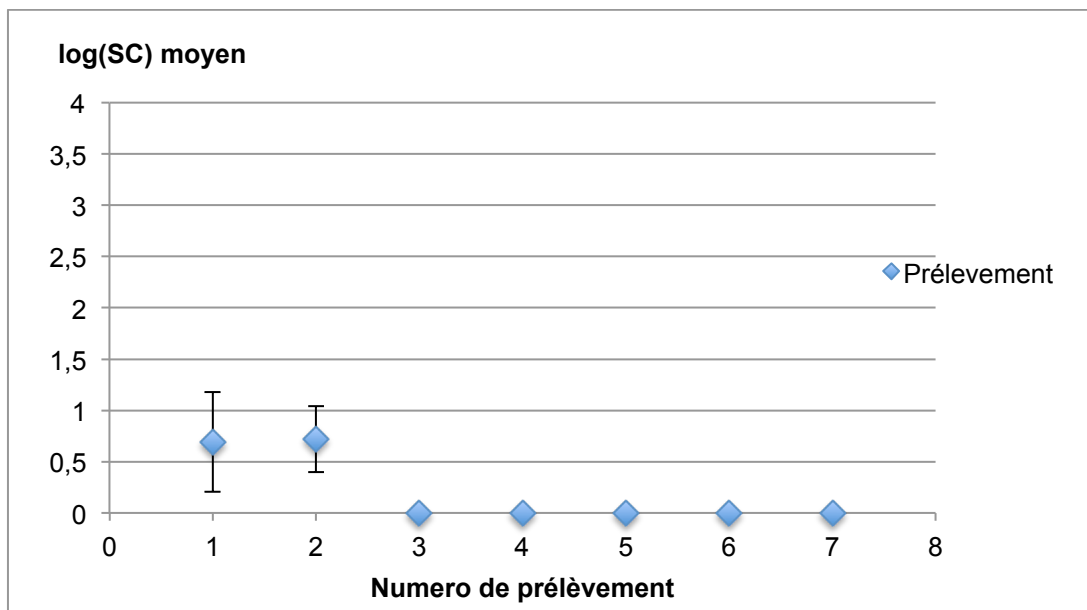
7.1.1.4 *Saccharomyces cerevisiae* (SC)

Le niveau en *Saccharomyces cerevisiae* est modifié de manière significative dans l'air, la bouse et le trayon (Tableau 4).

Tableau 4: Impact de la période sur le dénombrement des *Saccharomyces cerevisiae* pour tous les supports. Résultat de l'analyse de variance et du test de Tukey HSD, seuil de significativité p-value < 0,05.

| SUPPORT | PERIODE | | | | | | ANOVA | TukeyHSD |
|---------|---------------------|------|--------------------|------|-------------------|------|-----------------|---|
| | AV | | PT | | AP | | | |
| | moyenne (log) | SD | moyenne (log) | SD | moyenne (log) | SD | | |
| AIR | 0,7065 ^a | 0,4 | 0 ^b | 0 | 0 ^b | 0 | p-value < 0,001 | av-ap : 0 ; pt-av : 0 ; pt-ap:1 |
| BOUSE | 0,843 ^a | 0,45 | 2,187 ^b | 1,4 | 0,44 ^a | 0,93 | p-value < 0,001 | av-ap : 0,3 ; pt-ap < 0,001 ; pt-av < 0,001 |
| TRAYON | 0,924 ^a | 0,74 | 0,899 ^a | 0,81 | 0,3 ^b | 0,61 | p-value < 0,01 | av-ap < 0,01 ; pt-av : 0,9 ; pt-ap < 0,01 |
| LAIT | 0,77 | 0,59 | 0,479 | 0,75 | 0,4 | 0,79 | NS | |

La gélose utilisée pour dénombrer de manière spécifique les *Saccharomyces cerevisiae* était un support inhabituel pour le laboratoire Actalia. Ainsi, le dénombrement du support air montre une présence de *Saccharomyces cerevisiae* avant la distribution de levure mais plus « après » (Graphique 2). On peut donc supposer que pour éviter les faux négatifs, le laboratoire a préféré identifier plus de positifs ; au risque d'identifier des faux-positifs.

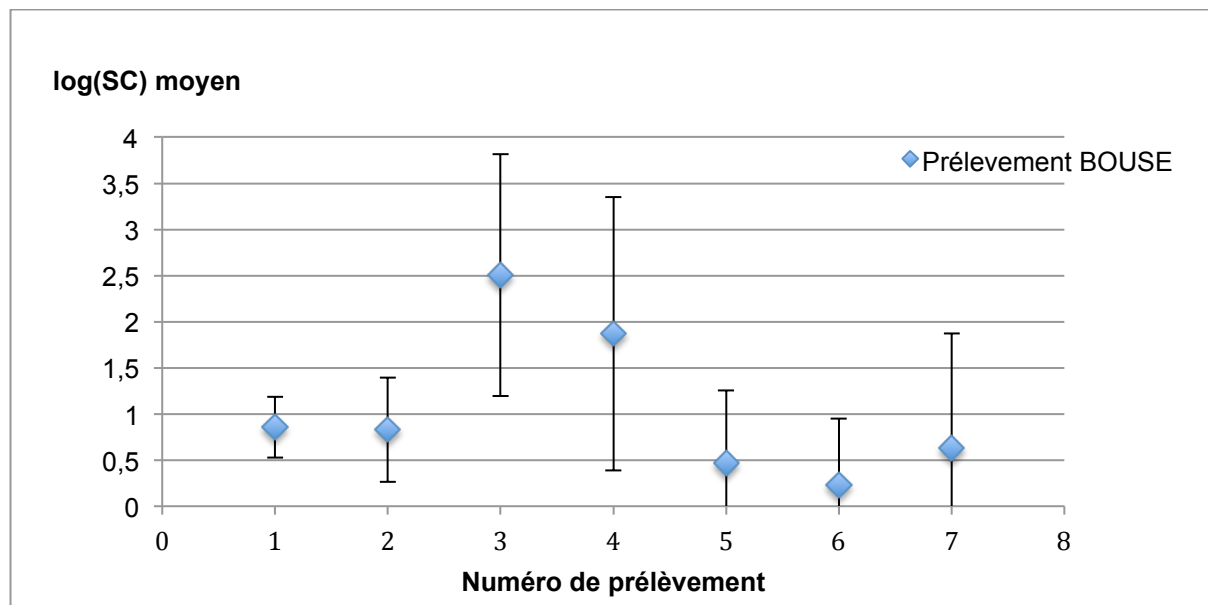


Graphique 2 : impact de la distribution de levures vivantes sur le dénombrement de SC dans le support de flore Air

On rappelle, que toutes les géloses identifiées positives au dénombrement de *Saccharomyces cerevisiae*, étaient envoyées au laboratoire de Lesaffre pour vérification et identification de la souche de *Saccharomyces cerevisiae*. Pour le support air, aucune SC47 n'a été identifié par Lesaffre pour la période « avant ».

On peut donc supposer ici que les SC dénombrées dans l'air avant distribution étaient une surestimation du laboratoire Actalia. A priori, on peut donc supposer que la distribution de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières, n'a aucun impact sur le niveau en SC du support de flore air (Tableau 4)

Le niveau de SC dans les bouses a aussi été modifié par la distribution de levures vivantes dans l'alimentation (Graphique 3)



Graphique 3 : Impact de l'ajout de levures vivantes sur le dénombrement de SC dans les Bouses

On a une différence significative entre les périodes « avant » et « pendant » avec une p-value de 0,0001 : augmentation du niveau de SC lors de la période « pendant » par rapport à la période « avant ».

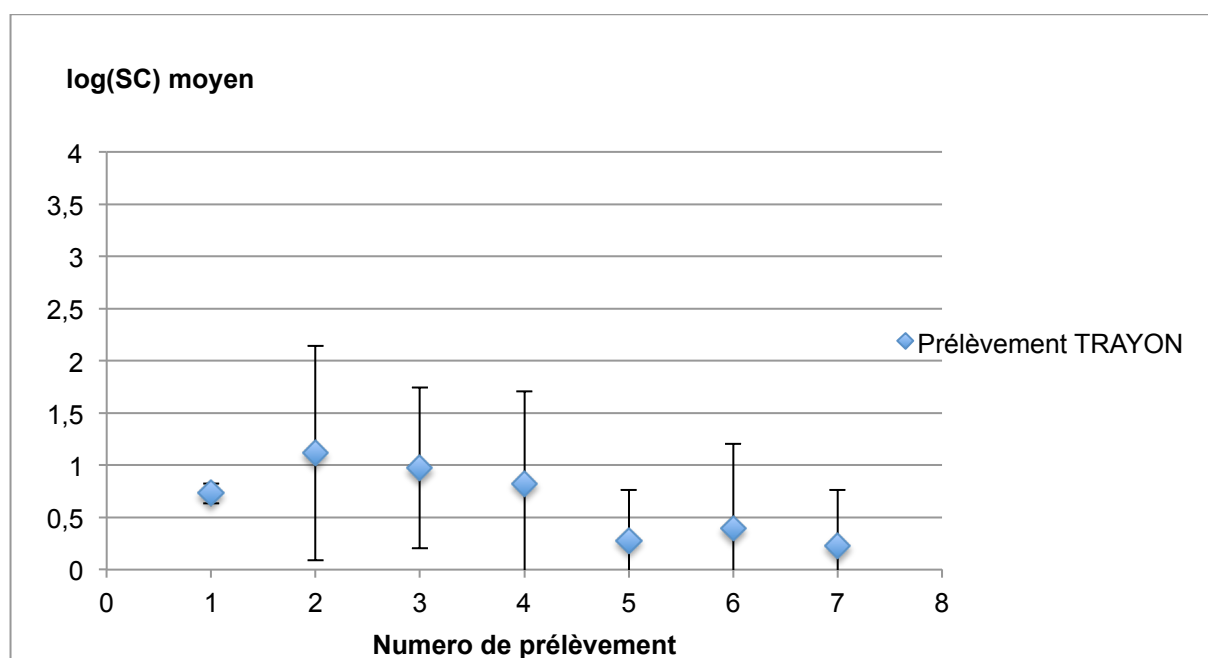
Entre les périodes « pendant » et « après », la différence est significative et la p-value est de $0,2 \cdot 10^{-7}$: diminution du niveau de SC lors de la période « après » par rapport à la période « pendant ».

Les périodes « avant » et « après » présentent un niveau de SC statistiquement similaires (p-value : 0,3) (Tableau 4).

Enfin, concernant le support trayon (Graphique 4), les levures ont un impact significatif sur le niveau de SC.

En effet, la période « avant » est significativement différente de la période « après » (p -value = 0,009) : le niveau de SC diminue entre la période « avant » et « après ».

La période « pendant » est significativement différente de la période « après » (p -value = 0,01) : le niveau de SC diminue entre la période « pendant » et « après ». Entre les périodes « pendant » et « avant », la différence n'est pas significative. Comme évoqué dans le cas de l'air, on peut supposer que le dénombrement lors de la période « avant » est surestimé.



Graphique 4: Impact de l'ajout de levures vivantes sur le dénombrement de *Saccharomyces cerevisiae* sur les trayons

Le niveau de SC dans le lait n'est pas modifié par la distribution de levures vivantes dans l'alimentation (p -value = 0,4) (Tableau 4).

7.1.2 L'apport du métabarcoding sur la présence ou non de *Saccharomyces cerevisiae*

Les résultats de métabarcoding permettent d'identifier la présence de *Saccharomyces cerevisiae* dans les échantillons.

On remarque alors que sa présence est bien réelle.

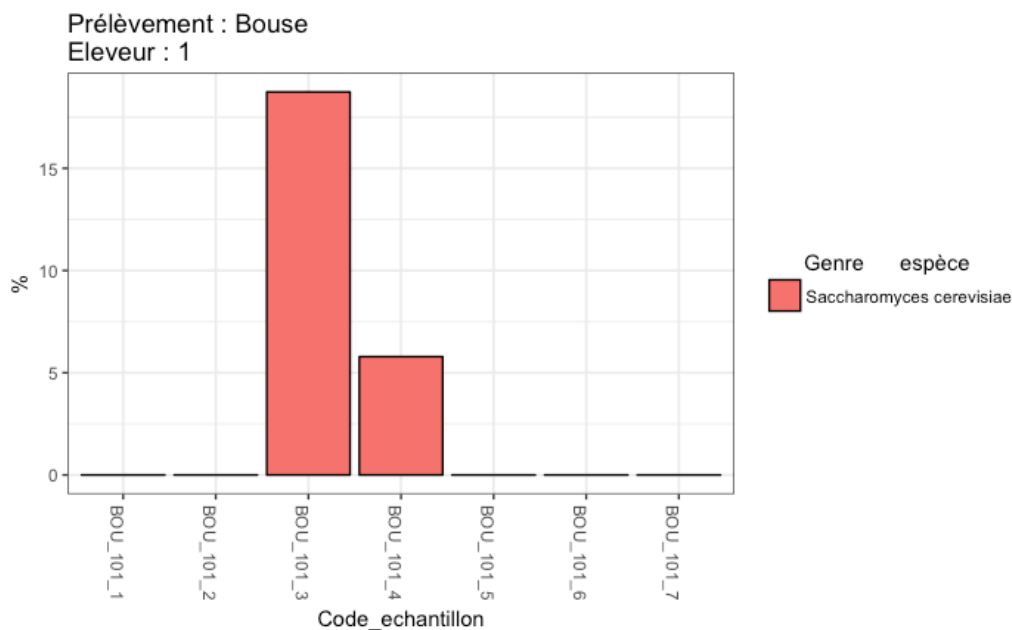
7.1.2.1 Pour l'air

Les prélèvements de cinq éleveurs sur dix ont plus de SC lors des prélèvements « pendant ». L'abondance se situe autour de 0,03 % des champignons présent dans l'air. Les prélèvements des cinq autres exploitations ne présentent pas de SC. Des biais d'échantillonnages peuvent expliquer ce résultat. En effet, les prélèvements d'air étaient réalisés dans le bâtiment, or certains éleveurs distribuaient la levure vivante dans la salle de traite ou au dans un DAC¹⁶. D'après le fabricant, cet additif est très peu volatil. Il n'y a pas de lien entre le mode de distribution des levures vivantes et la présence ou non de levure dans les prélèvements d'air.

¹⁶ Distributeur Automatique de Concentrés

7.1.2.2 Pour la bouse

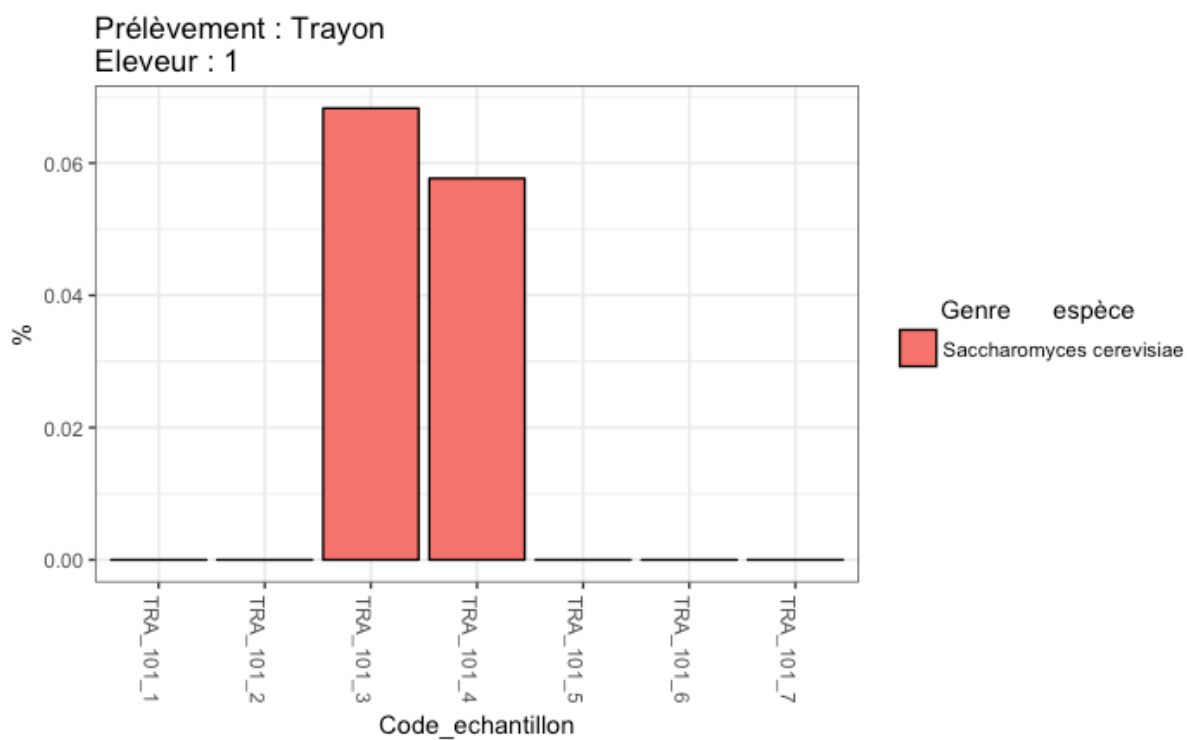
Les prélèvements de bouses des dix exploitations présentent une abondance importante de SC lors de la période de distribution. L'abondance de SC varie entre quelques pourcents et atteignent 60% des champignons présent dans les bouses chez un producteur (Graphique 5).



Graphique 5 : Présence de *Saccharomyces cerevisiae* chez l'éleveur 1 pour chaque prélèvement pour le support Bouse, un exemple.

7.1.2.3 Pour les trayons

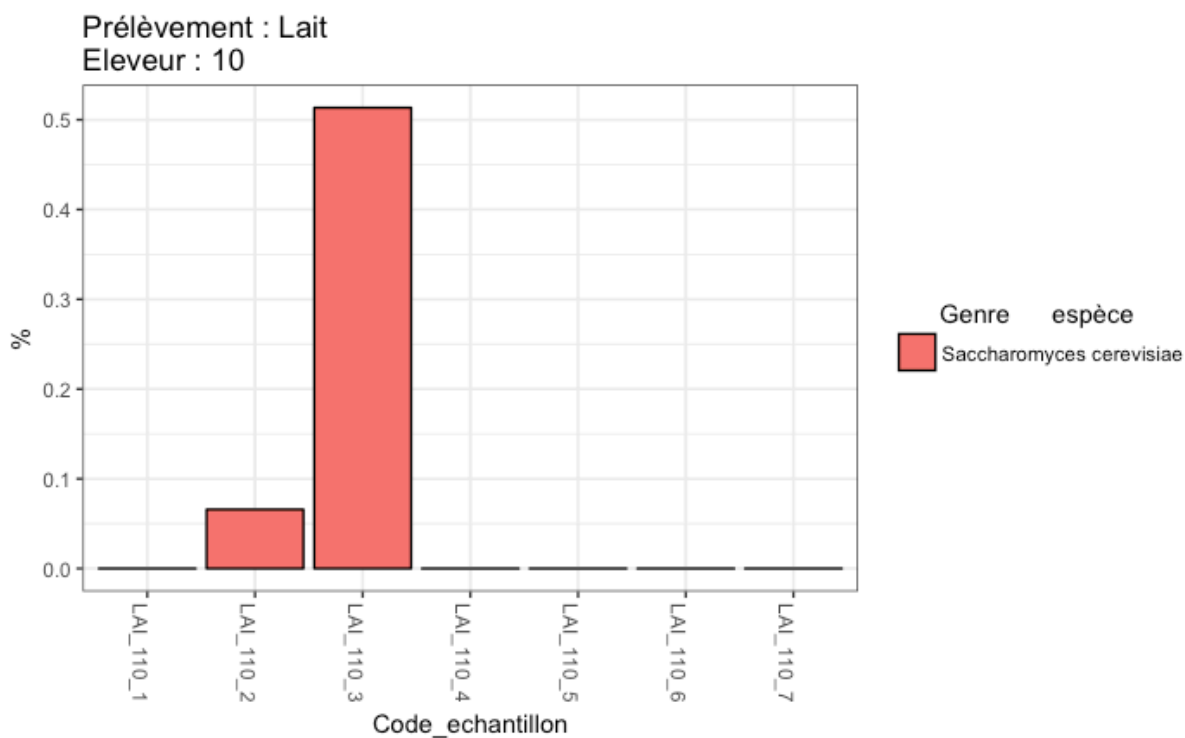
Les dix exploitations sont concernées par la présence de SC dans la flore des trayons avant préparation ; et ce lors de la période « pendant » exclusivement. L'abondance en SC varie entre 0,04 et 6 % des champignons présent et détectés sur les trayons avant préparation selon les exploitations (Graphique 6).



Graphique 6 : Présence de *Saccharomyces cerevisiae* chez l'éleveur 1 pour chaque prélèvement pour le support Trayon, un exemple

7.1.2.4 Pour le lait

Chez quatre éleveurs, on retrouve des SC dans les prélèvements d'air lors de la période « pendant » ; un seul présente une abondance en SC de 3,4% parmi les champignons présents dans le lait cru. Les autres prélèvements présentent une abondance en SC autour de 0,6% (Graphique 7).



Graphique 7 : Présence de SC chez l'éleveur 10 pour chaque prélèvement pour le support Lait, un exemple.

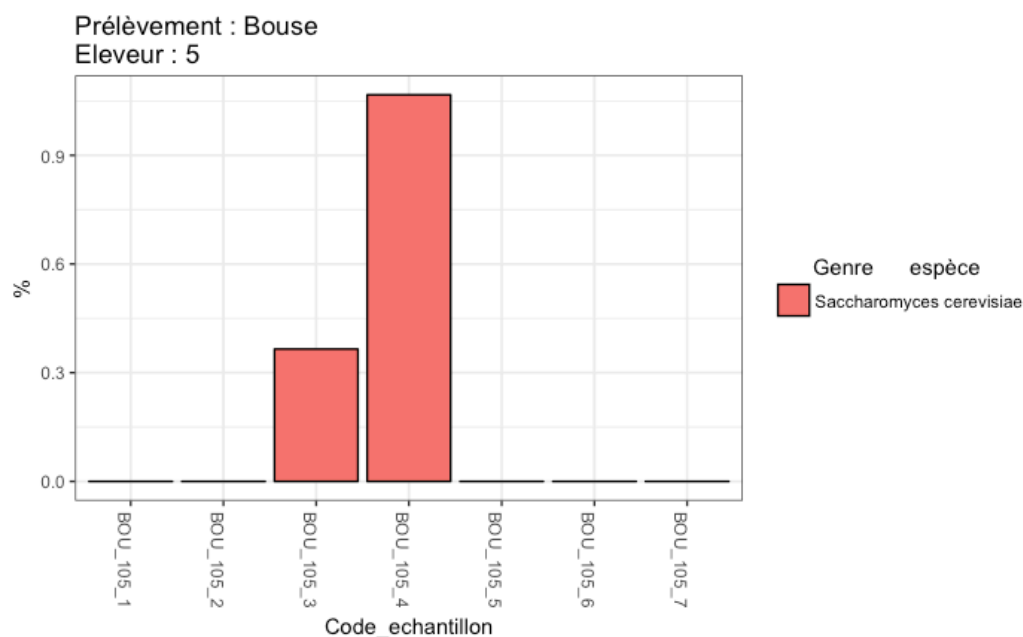
7.1.2.5 Un exemple particulier

Le producteur cinq trait dans une salle de traite de type deux fois trois en tandem. Il apporte les céréales et les levures vivantes lors de la traite en salle de traite.

Il existe donc un risque de contamination du lait par les levures vivantes.

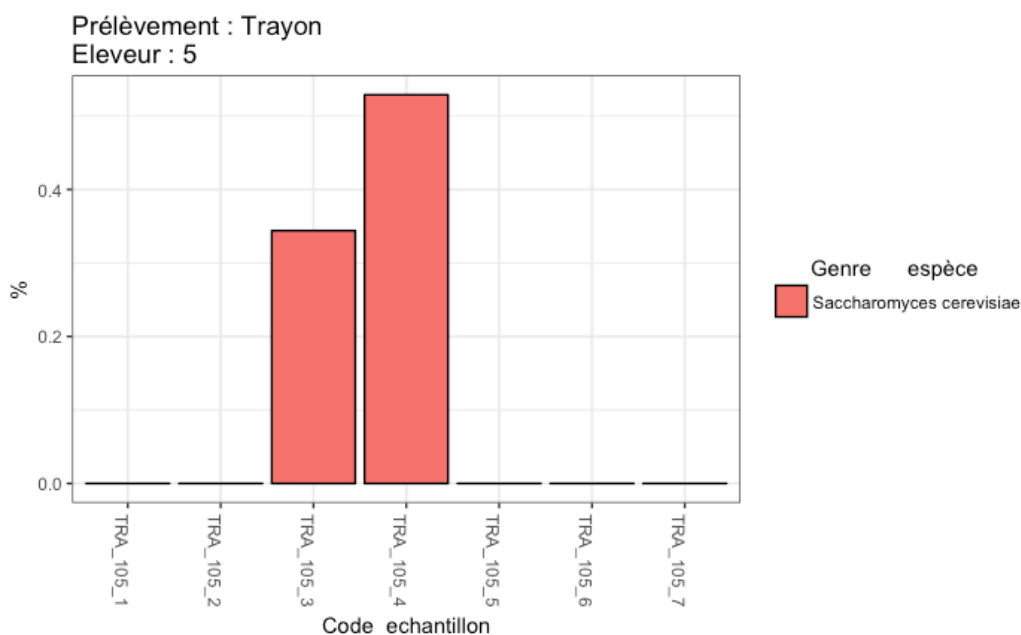
On observe chez lui les niveaux de SC les plus importants pour tous les supports.

Pour le support bouse, comme chez tous les éleveurs, on retrouve des levures de manière importante (Graphique 8).



Graphique 8 : Présence de *Saccharomyces cerevisiae* dans les Bouses chez l'éleveur 5 pour chaque prélèvement.

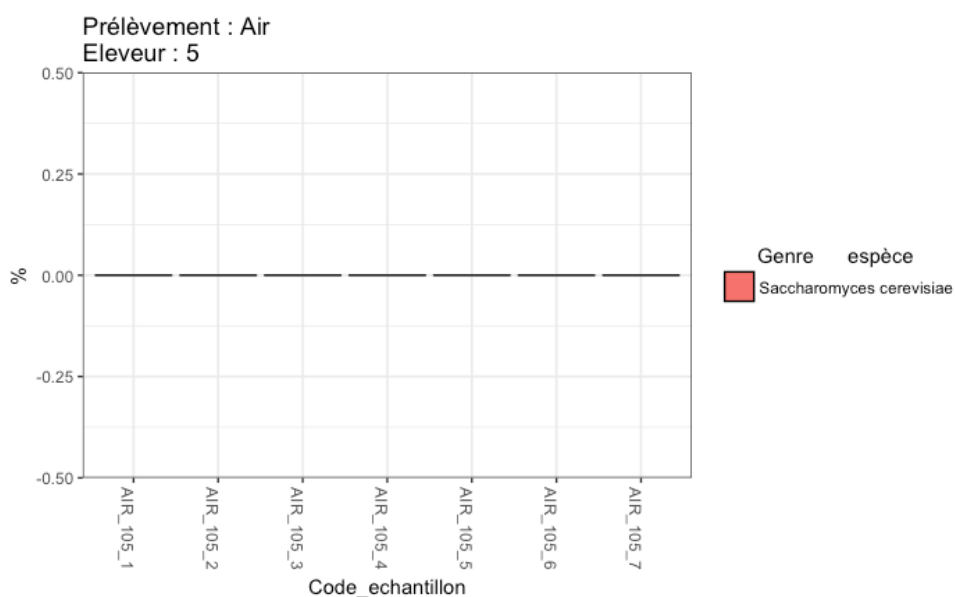
Pour le support trayon, des levures sont retrouvées en plus grand nombre lors de la période « pendant » (Graphique 9).



Graphique 9 : Présence de *Saccharomyces cerevisiae* sur les Trayons chez l'éleveur 5 pour chaque prélèvement.

P

Pour le support lait, on retrouve la présence de SC à un niveau d'environ 3,5% parmi les champignons présent et ce lors du prélèvement 3 (période « pendant ») (Graphique 10).

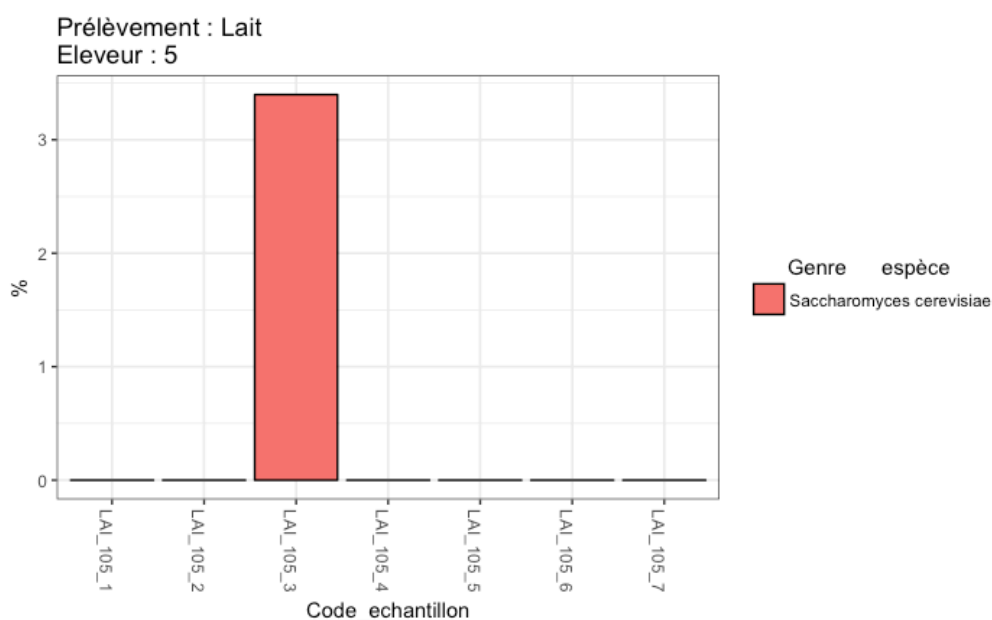


Graphique 10 : Présence de *Saccharomyces cerevisiae* dans le Lait chez l'éleveur 5 pour chaque prélèvement.

Pour le support air, le prélèvement a été réalisé dans le bâtiment, hors salle de traite. On voit donc qu'aucune SC n'est détecté dans l'air du bâtiment (Graphique 11).

On peut donc voir par ce résultat de métabarcoding que seul ce type de distribution de levure (pendant la traite, salle de traite en tandem) permet de voir des niveaux de SC aussi élevé dans les supports trayons et lait.

Au vu de ces résultats, il est nécessaire de passer par une identification précise de la souche de SC pour savoir précisément si l'augmentation du niveau de SC est dû à l'ajout de levure vivantes dans l'alimentation.



Graphique 11 : Présence de *Saccharomyces cerevisiae* dans l'air chez l'éleveur 5 pour chaque prélèvement

7.1.3 Résultats d'identification de la souche Sc47 selon les supports

Comme décrit précédemment, les géloses spécifiques des *Saccharomyces cerevisiae* sont transférées au laboratoire de Philéo Lesaffre lorsqu'elles sont positives, pour identification de la souche de *Saccharomyces cerevisiae*. Au total, les géloses de 87 échantillons ont été envoyées à la société Lesaffre.

Au final, on a bien une corrélation entre augmentation du niveau de levure et de *Saccharomyces cerevisiae* dans les bouses et sur les trayons et l'identification de la souche Sc47 (Tableau 5). La seule période où l'on retrouve des levures Sc47 dans

la bouse et sur les trayons est la période « pendant » la distribution de levures vivantes (prélèvement numéro 3 et 4).

Tableau 5 : Présence ou non de la souche Sc47 sur les différents support de flore (N : Non présence, 6 : présence de la souche Sc47 chez 6 éleveurs différents sur 10 pour ce numéro de prélèvement).

| Support/numéro de prélèvement | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| air | N | N | N | N | N | N | N |
| bouse | N | N | 8 | 7 | N | N | N |
| trayon | N | N | 5 | 6 | N | N | N |
| lait | N | N | N | N | N | N | N |

Quatre chantillons de lait sur sept n'étaient pas analysables (mention n/a) par Lesaffre. Outre ces quatre échantillons, aucune levure Sc47 n'a été retrouvée dans le lait.

La levure Sc47 n'est jamais retrouvée dans l'air.

On retrouve donc seulement la souche de levures vivantes Sc47 pendant la période de distribution de cette levure et sur les supports bouse et trayon.

Les levures ne sont pas présentes dans toutes les exploitations sur les trayons ou dans les bouses. Il est donc intéressant de pousser un peu plus loin afin de voir quelles sont les exploitations concernées. Est-ce un groupe d'éleveurs récurrent ou est-ce un hasard ?

Les échantillons contenant des levures vivantes Sc47 pendant la période de distribution correspondent à des éleveurs différents. On ne retrouve pas forcément les même éleveurs concernés entre le prélèvement 5 et le prélèvement 6 (Tableau 6).

Tableau 6 : Présentation des éleveurs concernés par la présence de levures vivantes Sc47 dans les échantillons trayon et bouse

| Numéro de prélèvement | 5 | | 6 | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | éleveurs avec levures | éleveurs sans levures | éleveurs avec levures | éleveurs sans levures |
| Trayon | | 1 | 1 | |
| | | 2 | 2 | |
| | | 3 | | 3 |
| | | 4 | 4 | |
| | 5 | | 5 | |
| | 6 | | 6 | |
| | 7 | | | 7 |
| | | 8 | 8 | |
| | 9 | | | 9 |
| | 10 | | | 10 |
| Bouse | 1 | | 1 | |
| | | 2 | | 2 |
| | 3 | | 3 | |
| | | 4 | 4 | |
| | 5 | | 5 | |
| | 6 | | 6 | |
| | 7 | | 7 | |
| | 8 | | | 8 |
| | 9 | | 9 | |
| | 10 | | | 10 |

Pour le support trayon, respectivement 5 et 6 éleveurs sur 10 sont concernés par la présence de levures vivantes Sc47 lors des prélèvements 5 et 6. La présence de levures sur les trayons semble aléatoire. Neuf éleveurs sont concernés au moins une fois et deux éleveurs sont concernés les deux fois.

Pour le support bouse, respectivement 8 et 7 exploitations sont concernées par la présence de levures vivantes dans les bouses lors des prélèvements 5 et 6. Seule l'exploitation 2 n'est jamais concernée. Neuf éleveurs sont concernés au moins une fois et six éleveurs sont concernés les deux fois. La présence de levures vivantes dans les bouses lors de l'ajout de ces dernières dans l'alimentation semble systématique.

Trois semaines après la fin de la distribution, la souche semble avoir disparu des bouses et de la flore des trayons.

7.2 Comment réagit l'écosystème des différents supports étudiés à l'ajout de levures vivantes Sc47 dans l'alimentation des vaches laitières ?

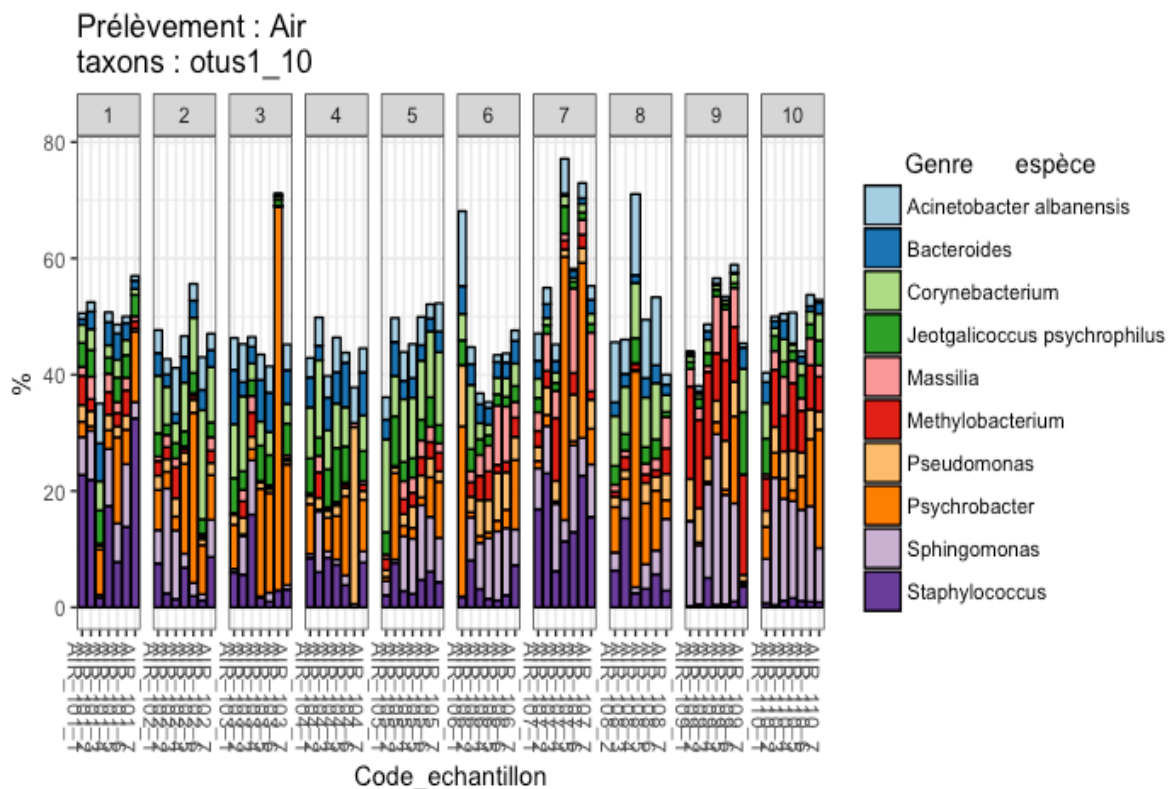
L'objectif du protocole est de repérer les flores présentant des levures pendant la période de distribution et d'objectiver les modifications de l'écosystème entraînées par l'ajout de levures vivantes dans l'alimentation. L'utilisation terminale de cette étude est d'éclairer la décision d'autoriser ou non l'utilisation des levures vivantes en région AOP et IGP en Savoie / Haute-Savoie. C'est donc la période « pendant » la distribution qui nous intéresse donc particulièrement. En effet, s'il est autorisé d'utiliser librement les levures vivantes dans l'alimentation, nous serons alors toujours dans la période « pendant ».

7.2.1 Observations générales

7.2.1.1 Les bactéries

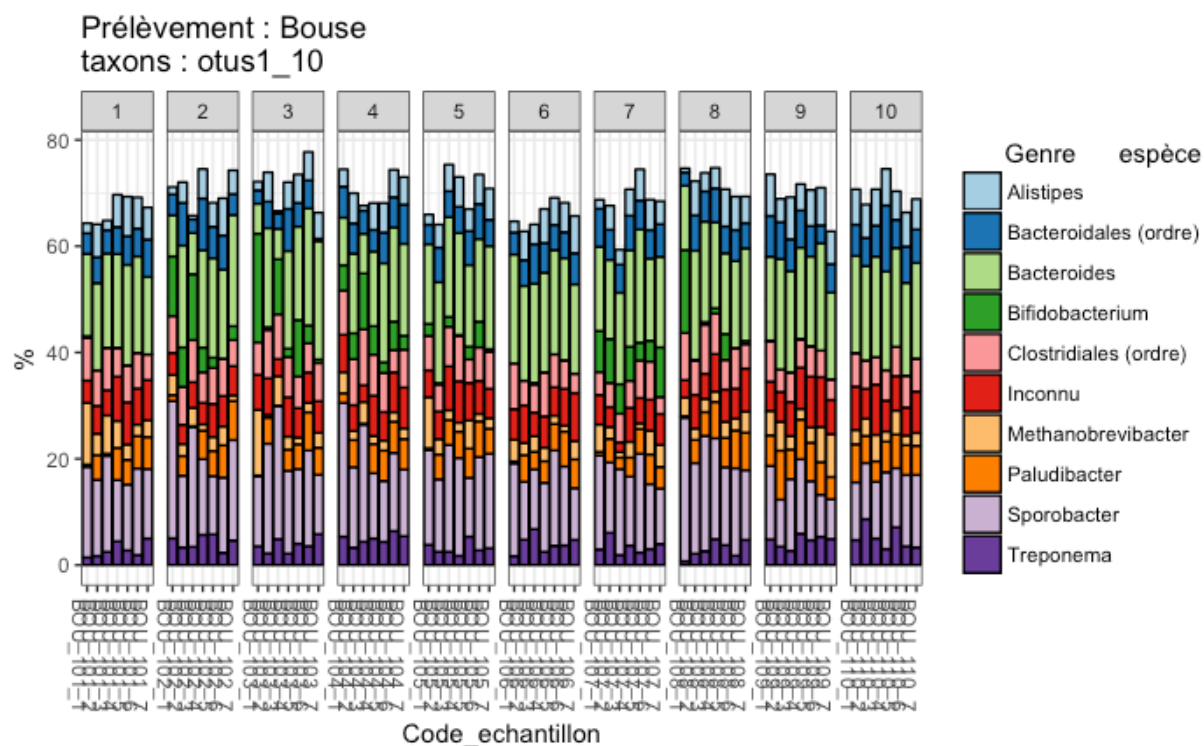
En ce qui concerne les bactéries, 277 OTUs différents pour tous les supports confondus ont été identifiés. La dominance des dix OTUs majoritaires est très variable selon le support considéré :

- Le support air : les dix OTUs majoritaires représentent 50% des OTUs. Ils sont dominés par les *Staphylococcus*, les *Sphingomonas* et les *Psychrobacter*. (Graphique 12)



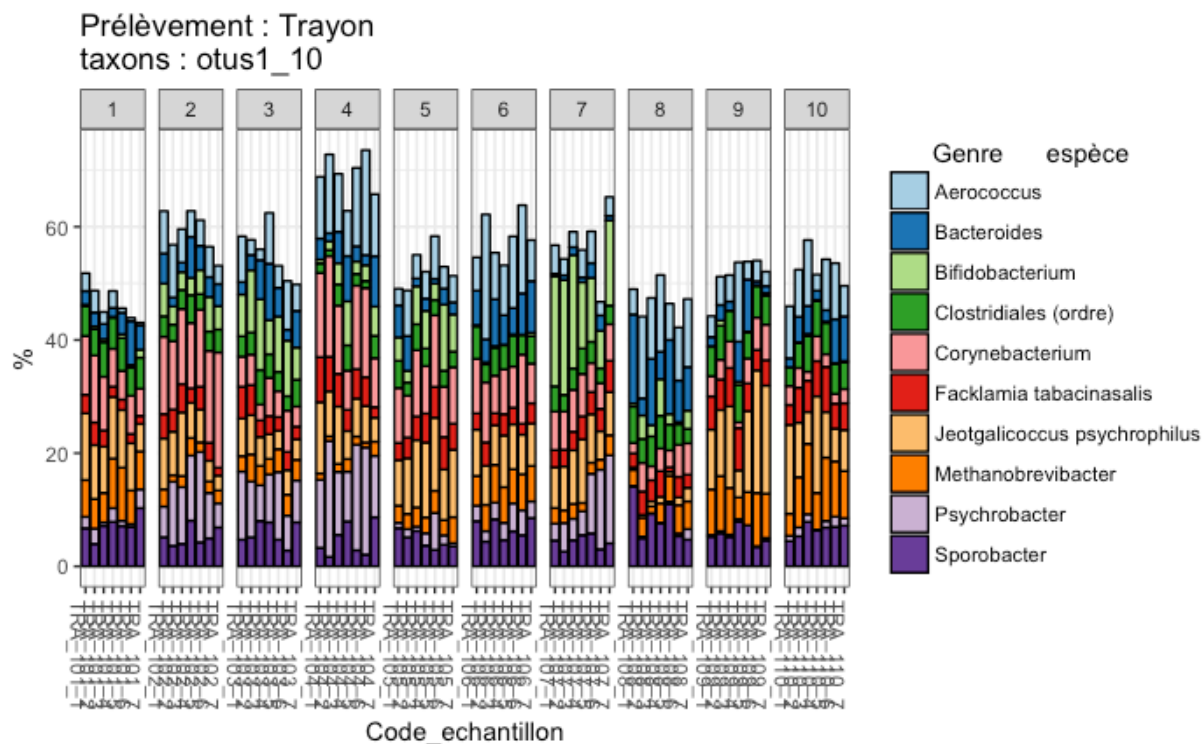
Graphique 12 : Répartition des dix OTUs bactériens majoritaires (abondances relatives les plus élevées) selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Air. Chaque diagramme vertical représente un prélèvement (de 1 à 7) et ce pour chaque éleveur (de 1 à 10)

- Le support bouse : les dix OTUs majoritaires représentent 70% des OTUs. Ils sont dominés par les Sporobacters et les Bifidobacterium. Globalement la proportion des OTUs est très stable par rapport aux autres supports de flore. (Graphique 13)



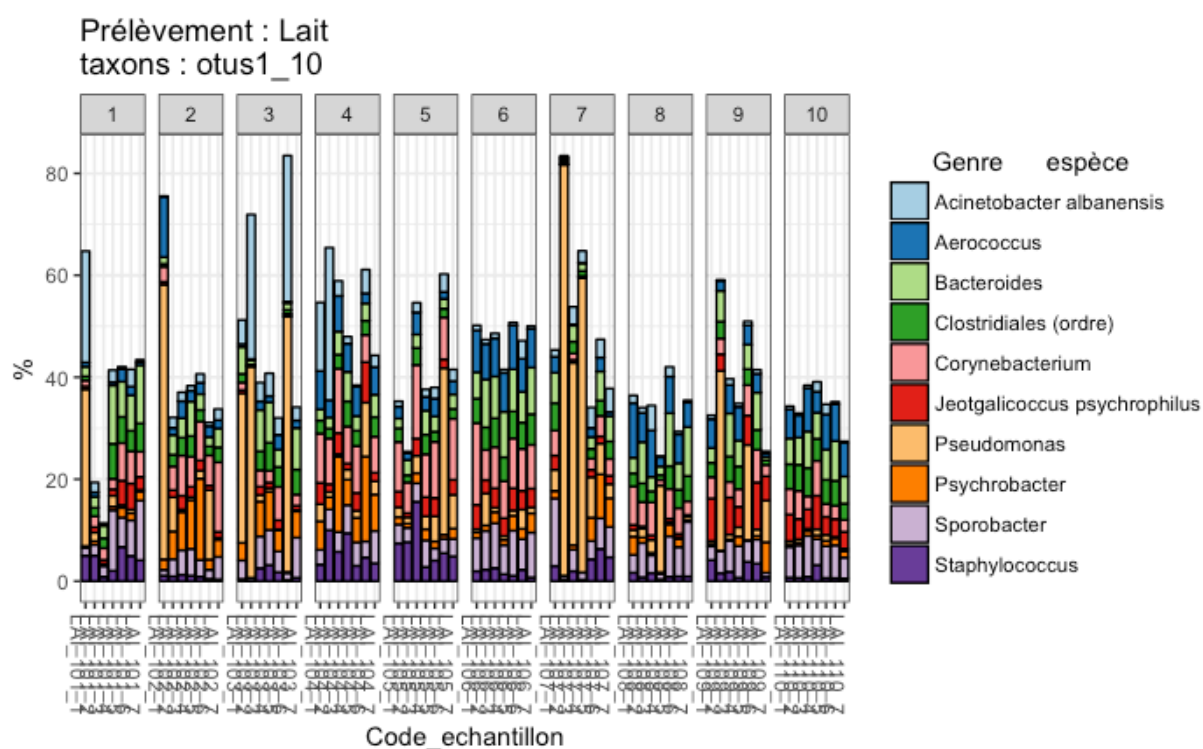
Graphique 13 : Répartition des dix OTUs bactériens ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Bouse

- Le support trayon : les dix OTUs majoritaires représentent 50 à 60% des OTUs. Ils sont dominés par les Sporobacters, les Corynebacterium, les Bifidobacterium et les Jeotgalicoccus psychrophilus (Graphique 14)



Graphique 14 : Répartition des dix OTUs bactériens ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Trayon

- Le support Lait : les dix OTUs majoritaires sont représentés de manière très variable entre les exploitations mais également au sein d'une même exploitation. Globalement, les OTUs majoritaires représentent 40 à 60% des OTUs. On retrouve les Sporobactes, les Corynebactérium et les Bactéroides. Des laits particuliers peuvent être identifiés : les laits dit « à *Pseudomonas* » : ce dernier devient le micro-organisme le plus présent dans ce type de lait ayant été en contact avec de l'eau stagnante (Graphique 15)

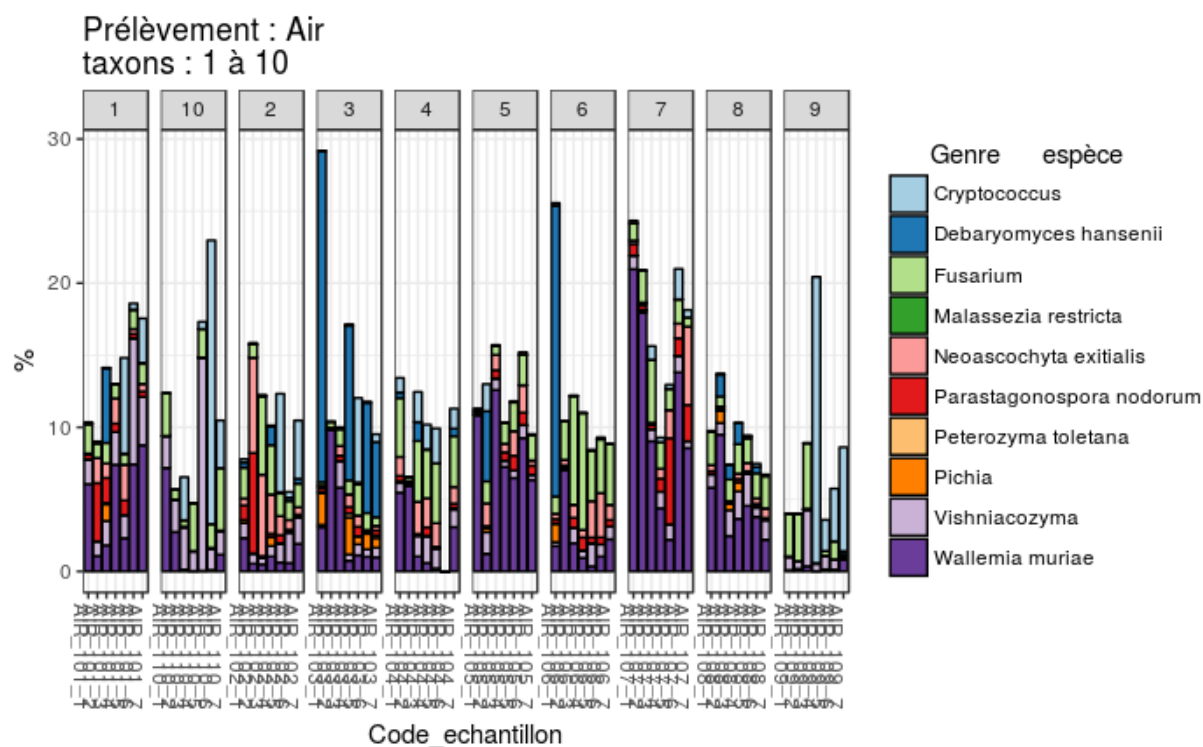


Graphique 15 : Répartition des dix OTUs bactériens ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Lait

7.2.1.2 Les champignons

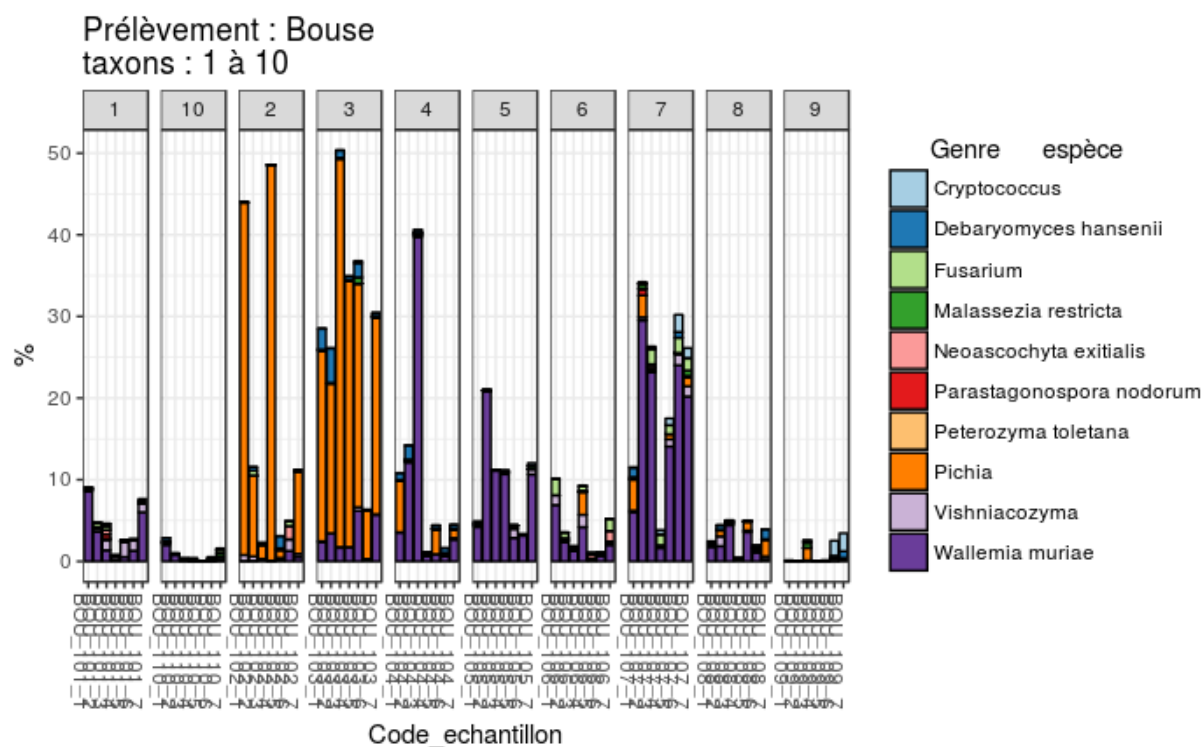
Les populations fongiques pour tous les supports confondus sont caractérisées par 230 OTUs différents. A la différence des populations bactériennes, les populations fongiques sont peu dominées par les dix OTUs majoritaires. De plus, les différences inter-exploitations sont très importantes. Dix OTUs ont été sélectionnés pour être les majoritaires mais en réalité seuls deux ou trois sont majoritairement présents dans les écosystèmes.

- Le support air : les dix OTUs majoritaires sont représentés de manière très variable selon les exploitations et même au sein d'une même exploitation selon le numéro de prélèvement. Ainsi, pour une même exploitation les dix majoritaires peuvent représenter 4 à 25% des OTUs. Les champignons majoritairement représentés sont *Wallemia muriae* et *Fusarium* (Graphique 16)



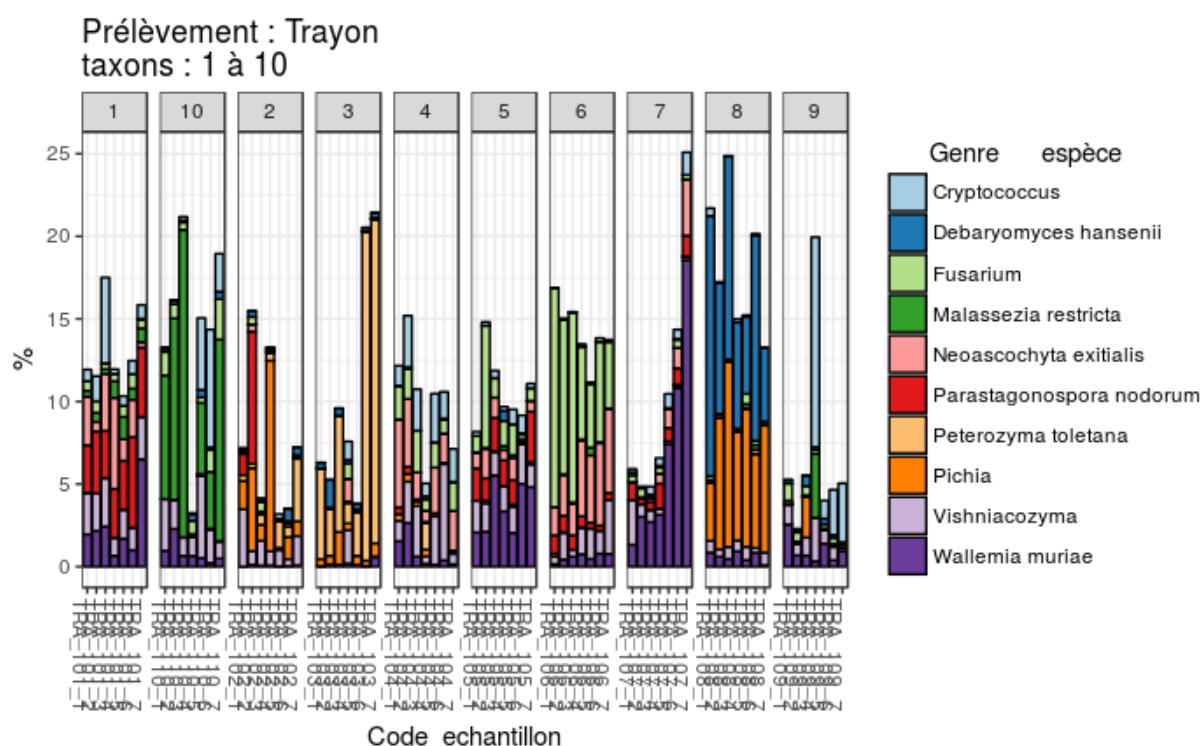
Graphique 16 : Répartition des dix OTUs fongiques ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Air

- Le support bouse : selon l'exploitation agricole considérée le champignon principal n'est pas le même. Pour les exploitations 2 et 3, c'est *Pichia* qui est principalement présent (de 2 à 50%). La variabilité intra-exploitation est très importante (de 3 à presque 50% pour l'exploitation 3). (Graphique 17). Pour les autres, c'est *Walleimia muriae* qui prédomine.



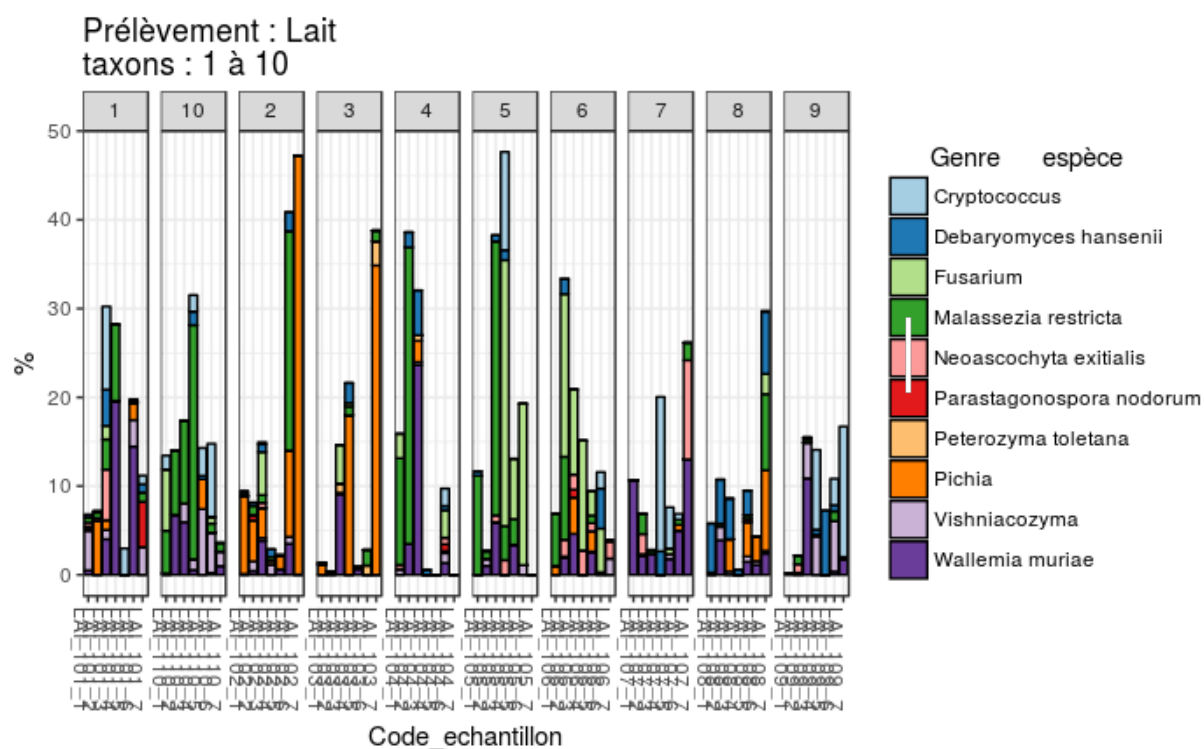
Graphique 17 : Répartition des dix OTUs fongiques ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Bouse

- Le support trayon : pour ce support également, la répartition intra-exploitation est très variable ; pour l'exploitation 9, la représentation peut s'échelonner de 2 à 20% par exemple. De même, la représentation des OTUs majoritaires est variable entre les exploitations. Ainsi, le producteur numéro 8 est le seul à avoir comme représentants majoritaires *Pichia* et *Debaryomyces hansenii* et chez le producteur 10 on trouve principalement *Malassezia restricta*. (Graphique 18).



Graphique 18 : Répartition des dix OTUs fongiques ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Trayon

- Le support lait : ici encore la variation intra et inter exploitation est importante que ce soit en type d'OTU majoritaire mais également en représentation des OTUs majoritaires. L'exploitation numéro 2 lors du prélèvement numéro 6 est donc majoritairement représentée par *Malassezia restricta* alors que lors du prélèvement numéro 9 c'est plutôt *Pichia* qui est majoritaire. Globalement, les OTUs les plus représentés sont *Pichia*, *Malassezia restricta* et *Walleimia muriae* (Graphique 19)



Graphique 19 : Répartition des dix OTUs fongiques ayant l'abondance relative la plus élevée selon le numéro de prélèvement et le producteur pour le support Lait

7.2.2 Diversité Alpha

| | AIR | | | BOUSE | | | TRAYON | | | LAIT | | |
|------------|---------|--------|-----------|---------|-------|---------------|---------|-------|-----------|---------|-------|--------------|
| | moyenne | SD | Tukey HSD | moyenne | SD | Tukey HSD | moyenne | SD | Tukey HSD | moyenne | SD | Tukey HSD |
| Shannon | av | 3,85 | 0,27 | 3,87a | 0,23 | av-ap : 0,01 | 3,72 | 0,28 | | 3,72a | 0,56 | av-ap : 0,05 |
| | pt | 3,83 | 0,49 | 3,91b | 0,21 | pt -ap : 0,07 | 3,8 | 0,18 | NS | 3,91b | 0,73 | pt-ap : 0,9 |
| | ap | 3,64 | 0,61 | 4,02a | 0,09 | pt-av : 0,7 | 3,79 | 0,28 | | 3,99c | 0,45 | pt-av : 0,16 |
| p-value | NS | | | 0,008 | | | NS | | | 0,02 | | |
| Chao1 | av | 208,76 | 29,04 | 142,01 | 15,85 | | 190,66 | 24,54 | | 230,93 | 21,2 | |
| | pt | 211,07 | 33,96 | 144,92 | 14,57 | NS | 192,93 | 22,04 | NS | 231,03 | 10,92 | NS |
| | ap | 199,26 | 47,78 | 143,92 | 10 | | 190,32 | 24,14 | | 226,79 | 17,42 | |
| p-value | NS | | | NS | | | NS | | | NS | | |
| InvSimpson | av | 23,11a | 6,92 | 20,99a | 7,49 | av-ap : 0,02 | 20,99 | 6,06 | | 20,69a | 11,12 | av-ap : 0,11 |
| | pt | 24,1a | 9,62 | 21,96b | 7 | pt-ap : 0,04 | 21,96 | 4,32 | NS | 26,96b | 12,68 | pt-ap : 0,9 |
| | ap | 20b | 7,74 | 22,76c | 4,94 | pt-av : 0,9 | 22,76 | 6,72 | | 26,22b | 10,25 | pt-av : 0,08 |
| p-value | 0,03 | | | 0,01 | | | NS | | | 0,01 | | |
| OTU | av | 171,05 | 35,6 | 164,25 | 12,92 | | 164,25 | 23,55 | | 209,4 | 16,54 | |
| | pt | 172,65 | 41,68 | 168,9 | 14,41 | NS | 168,9 | 22,7 | NS | 222,5 | 17,53 | NS |
| | ap | 167,5 | 50,43 | 159,97 | 10,43 | | 159,97 | 17,11 | | 217,6 | 15,5 | |
| p-value | NS | | | NS | | | NS | | | NS | | |

Tableau 7 : Diversité alpha des bactéries dans les 4 supports prélevés et impact de la distribution de levures vivantes sur les indices de biodiversités (valeur de la moyenne des indices de biodiversité et leur écart type SD. On a un impact significatif de la période si $p < 0,05$ calculé grâce à une ANOVA).

L'étude des indices de diversités alpha permet d'aborder les modifications potentielles de l'écosystème. Ils permettent de se focaliser sur certaine partie de l'écosystème : les OTUs majoritaires ou les OTUs minoritaires et la richesse ou l'équitabilité. La diversité alpha permet de mesurer la diversité d'un échantillon unique. En comparant les moyennes des échantillons d'un même groupe, on estime l'impact de la distribution de levures.

7.2.2.1 Bactéries

7.2.2.1.1 Air

Pour le support air, seul l'indice inverse Simpson est affecté par la période. La période « pendant » est significativement différente de la période « après » ($p = 0,03$, les moyennes sont respectivement de 24,1 et 20). Au contraire, les indices de richesse (nombre d'OTUs et Chao1) ne sont pas affectés par la période. On peut donc supposer que c'est l'équitabilité de l'écosystème « air » qui est affectée (Tableau 7). Par ailleurs, l'inverse de Simpson est surtout affecté par les OTUs dominants (Graphique 1), on peut donc supposer que c'est l'équitabilité des OTUs dominants qui est modifiée par la période de distribution.

On a donc une représentation plus homogène des OTUs, les OTUs dominants sont moins présents lors de la période « pendant ». Lors de la période « après », l'indice Inverse de Simpson diminue, on a donc une diminution de l'équitabilité « après » et des OTUs dominants plus majoritaires.

7.2.2.1.2 Bouse

Le nombre d'OTUs et l'indice de Chao1 ne semblent pas être affectés par la période, au contraire, des indices de Shannon et d'inverse Simpson, qui eux, permettent de faire apparaître 2 états de l'écosystème différents : « avant » et « après » (Tableau 7).

Les périodes « avant » et « après » sont significativement différentes (Indice de Shannon : $p = 0,008$ et inverse Simpson : $p = 0,01$). Les indices de biodiversité augmentent entre les périodes « avant » et « après ». On a donc une répartition plus homogène de la représentation des différents OTUs dominants et rares lors de la période « après ».

7.2.2.1.3 Trayon

Aucun indice de biodiversité n'est affecté par la distribution de levure.

7.2.2.1.4 Lait

De même que l'écosystème de la bouse, l'écosystème du lait est affecté par la distribution de levure. L'indice de Shannon nous montre que la période « avant » est significativement différente de la période « après » (p-value : 0,05). L'inverse de Simpson nous montre quant à lui que la période « avant » est significativement différente de la période « pendant » (p-value : 0,01) (Tableau 7).

Les indices de richesse ne sont quant à eux pas affectés par les périodes de distribution. On peut donc supposer que c'est l'équitabilité de l'écosystème qui est affectée par la distribution de levures dans l'alimentation.

Les indices de biodiversité ont une valeur qui augmente entre « avant » et « après », les différents OTU sont donc représentés de manière plus homogène lors de la période « après ».

7.2.2.2 *Fungi*

7.2.2.2.1 Air, Bouse et Lait

Pour ces trois supports, aucune modification des indices de biodiversité n'est relevée en fonction de la période. La population fongique dans l'écosystème de l'air, de la bouse et du lait n'est pas modifiée par la distribution de levures vivantes (Tableau 8).

| | AIR | | | BOUSE | | | TRAYON | | | LAIT | | |
|------------|---------|--------|-----------|---------|-------|-----------|---------|-------|-------------|---------|-------|-----------|
| | moyenne | SD | Tukey HSD | moyenne | SD | Tukey HSD | moyenne | SD | Tukey HSD | moyenne | SD | Tukey HSD |
| Shannon | av | 2,74 | 0,7 | 2,16 | 0,59 | | 2,8 | 0,49 | | 2,28 | 0,49 | |
| | pt | 3,11 | 0,36 | 1,97 | 0,7 | NS | 2,84 | 0,34 | NS | 2,4 | 0,58 | NS |
| | ap | 3,04 | 0,7 | 2,22 | 0,59 | | 2,82 | 0,45 | | 2,27 | 0,68 | |
| p-value | NS | | | NS | | | NS | | | NS | | |
| Chao1 | av | 113,66 | 27,74 | 81,01 | 16,07 | | 122,35 | 19,09 | av-ap : 0,4 | 30,49 | 13,79 | |
| | pt | 133,54 | 23,1 | 82,58 | 19,72 | NS | 126,63a | 14,79 | pt-ap : 0,1 | 25,6 | 11,78 | NS |
| | ap | 123,22 | 35,49 | 76,39 | 14,89 | | 115,32b | 22,59 | pt-av : 0,7 | 29,84 | 32,04 | |
| p-value | NS | | | NS | | | 0,04 | | | NS | | |
| InvSimpson | av | 10,1 | 5,93 | 5,25 | 2,99 | | 10,19 | 6 | | 7,21 | 4,18 | |
| | pt | 12,6 | 4,57 | 4,54 | 3,41 | NS | 9,04 | 3,07 | NS | 8,96 | 4,61 | NS |
| | ap | 12,82 | 6,53 | 5,25 | 2,82 | | 10,17 | 4,87 | | 8,24 | 5,41 | |
| p-value | NS | | | NS | | | NS | | | NS | | |
| OTU | av | 100,7 | 29,7 | 77 | 15,33 | | 111,95 | 16,75 | av-ap : 0,3 | 29,47 | 12,68 | |
| | pt | 116 | 25,9 | 78,8 | 18,84 | NS | 114,5a | 13,56 | pt-ap : 0,1 | 24,95 | 10,75 | NS |
| | ap | 109,6 | 32,87 | 74,37 | 14,09 | | 103,9b | 22,59 | pt-av : 0,9 | 28,21 | 27,58 | |
| p-value | NS | | | NS | | | 0,03 | | | NS | | |

Tableau 8 : Diversité alpha des fongiques dans les 4 support prélevés et impact de la distribution de levures vivantes sur les indices de biodiversités (valeur de la moyenne des indices de biodiversité et leur écart type SD. On a un impact significatif de la période si $p < 0,05$ calculé grâce à une ANOVA)

7.2.2.2.2 Trayon

Sur le trayon, les indices de richesses de l'écosystème sont significativement affectés par la période. En effet, Chao1 présente une différence entre les périodes « pendant » et « après » (p-value : 0,04). De même, le nombre d'OTUs est modifié puisque les périodes « pendant » et « après » sont différentes aussi (p-value : 0,03). C'est donc la richesse de l'échantillon qui est modifiée et non l'équitabilité (Tableau 8). On voit que l'indice Chao1 et le nombre d'OTU sont plus élevés lors de la période « pendant » que lors de la période « après ». Chao1 est principalement affecté par les OTU rare.

On peut donc supposer que les OTUs les plus rares sont présents en plus grands nombres « pendant ».

7.2.3 LDA – Linear Discriminant Analysis

L'analyse LDA réalisée avec Galaxie permet de déterminer les caractéristiques (ici les OTUs) qui expliquent le plus probablement les différences entre les périodes (Segata et al. 2011), en croisant les populations des différents supports selon les 3 périodes (avant, pendant et après).

Plus précisément, ici, la LDA permet d'aborder l'écosystème et ses modifications sous un angle différent de la diversité alpha ; on pourra interpréter la LDA comme la présentation d'espèces ayant un comportement différent des autres.

7.2.3.1.1 Bactéries

En ce qui concerne les populations de bactéries, seul l'écosystème du lait présente une modification (Figure 11)

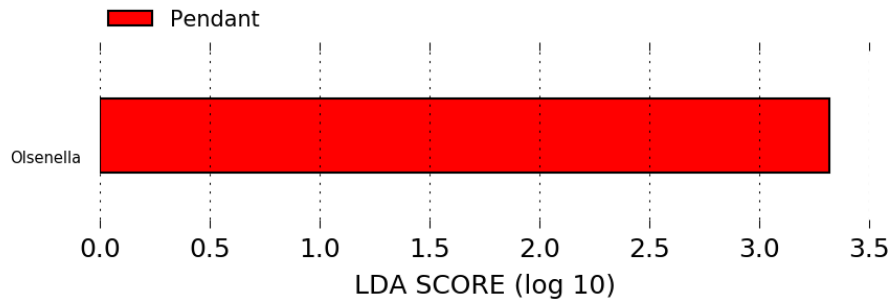


Figure 11: LDA (Linear Discriminant Analysis) des OTUs bactériens significativement différents pour le support lait et selon la période (avant, pendant et après)

La bactérie *Olsenella* est donc beaucoup plus présente lors de la période « pendant » par rapport aux périodes « avant » et « après » (Figure 12). L'abondance relative de cet OTU est très faible.

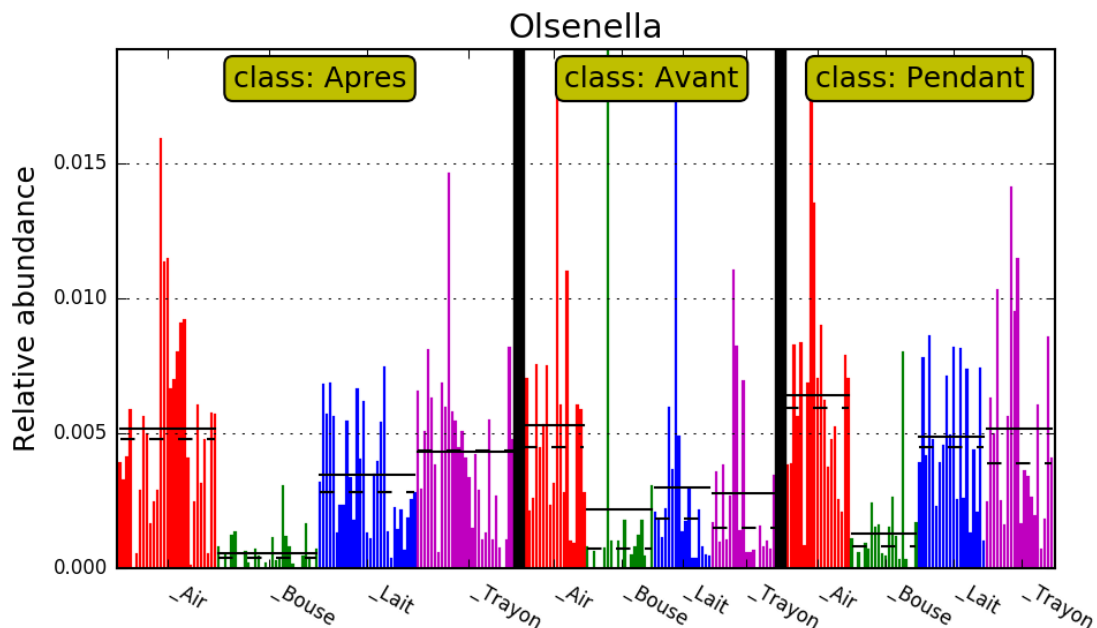


Figure 12 : Abondance relative du Genre *Olsenella* selon le support et la période de distribution. La période a un impact seulement sur le support lait, où *Olsenella* est plus abondant lors de la période "pendant".

Appartenant au phylum Actinobacteria, les bactéries du genre *Olsenella* font partie de la flore lactique d'affinage. Cette bactérie d'affinage en général issue du réservoir trayon peut avoir comme origine le foin ou le pâturage.

7.2.3.1.2 Les champignons

Pour les champignons, seuls les supports air et bouse présentent des différences d'OTUs.

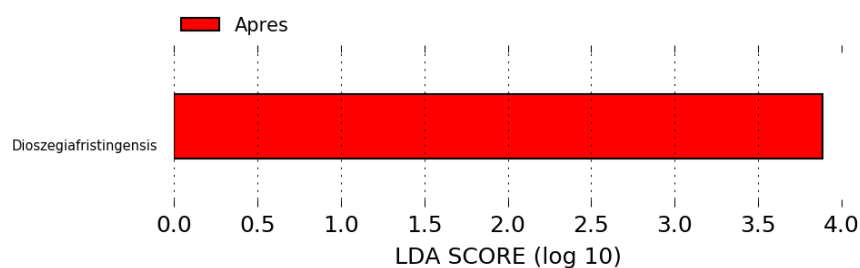


Figure 13: LDA (linear Discriminant Analysis) des OTUs fongiques significativement différents pour le support air et selon la période (avant, pendant et après)

Pour le support air, c'est le champignon *Dioszegia fristingensis* qui se comporte de manière différente selon les périodes (Figure 13). On a donc plus de

Dioszegia fristingensis lors de la période « après » que lors des périodes « avant » et « pendant ». Ce champignon de la famille des *Tremellaceae*, est un parasite d'autres champignons et des levures.

Pour le support bouse, on retrouve les *Saccharomyces cerevisiae* en grand nombre lors de la période « pendant » (Figure 14). Ce qui est cohérent avec les résultats précédents. On a vu que le niveau de levures vivantes dans la bouse augmente lors de la période de distribution.

On aurait pu supposer de même pour la flore des trayons, les SC sont peut-être en très faible quantité.

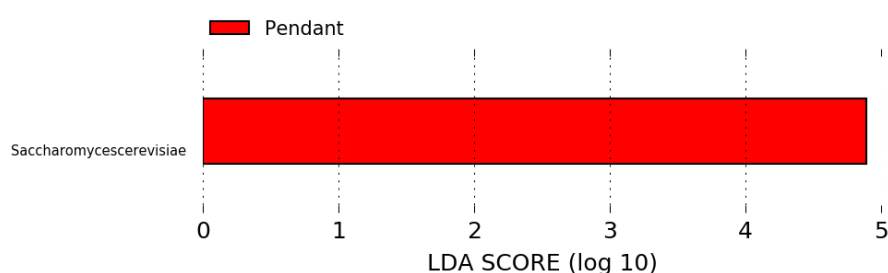


Figure 14 : LDA (Linear Discriminant Analysis) des OTUs fongiques significativement différents pour le support bouse et selon la période (avant, pendant et après)

On voit cependant que SC est présente en très faible quantité (abondance relative entre 0,002 et 0,008 %) (Figure 15)

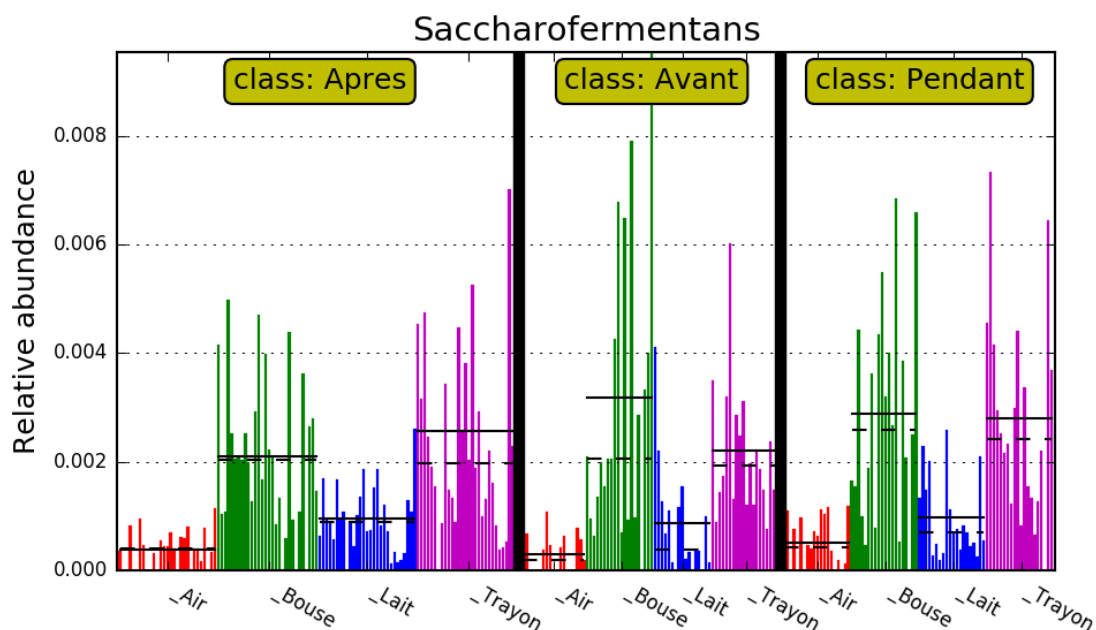


Figure 15 : Abondance relative du genre *Saccharomyces* selon le support et la période de distribution. La période a un impact seulement sur le support bouse, où *Saccharomyces* est plus abondant lors de la période "pendant".

7.2.4 Diversité Beta

La diversité beta permet d'objectiver à un niveau plus global la diversité des espèces au sein d'un écosystème et l'influence de différents facteurs sur cette diversité.

7.2.4.1 Analyse multi-variée

7.2.4.1.1 Bactérie

L'exploitation statistique (PERMANOVA) des résultats de l'analyse multi-variée (NMDS) pour les bactéries montre qu'il n'y a aucune influence de la période de distribution sur la structure de la population de bactérie (Tableau 9) (ANNEXE 6 : Représentation NMDS et PERMANOVA associées, pour la population bactérienne) Statistiquement la distribution de levures vivantes n'a pas d'impact significatif sur la population de bactérie.

Tableau 9 : Impact de la période de distribution de la levure sur l'écosystème bactérien des différents supports prélevés. Pour que l'impact soit positif, on veut une Adonis p-value < 0,05 et une Beta-dispersion p-value >0,05. NS : Non Significatif

| Support | p-value : distribution levure | | |
|---------|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| | Adonis | Beta dispersion | Significativité |
| Air | 0,744 | 0,895 | NS |
| Bouse | 0,2 | 0,05 | NS |
| Trayon | 0,26 | 0,6 | NS |
| Lait | 0,313 | 0,455 | NS |

Bien que des levures vivantes soient retrouvées dans les bouses, elles n'ont pas d'impact global sur l'écosystème bactérien (à l'échelle de l'indice de biodiversité, la distribution de levures augmente l'équitabilité lors de la période « après »).

Le support trayon contient des levures vivantes Sc47 lors de la période de distribution. Par contre, cette contamination n'entraîne aucune modification de l'écosystème bactérien.

7.2.4.1.2 Champignons

Tableau 10 : Impact de la période de distribution de la levure sur l'écosystème fongique des différents supports prélevés. On veut de même que l'Adonis p-value < 0,05 et la Beta-dispersion p-value >0,05 pour que l'impact soit positif.

| Support | p-value : distribution Fungi | | |
|---------|------------------------------|-----------------|-------------------------|
| | Adonis | Beta dispersion | Significativité |
| Air | 0,004 | 0,58 | Oui, adonis av-ap 0,001 |
| Bouse | 0,158 | 0,58 | NS |
| Trayon | 0,93 | 0,98 | NS |
| Lait | 0,02 | 0,6 | Oui, adonis av-ap 0,002 |

Au contraire des bactéries, la population fongique est affectée par la distribution de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières (Tableau 10).

On constate donc que la population fongique du lait est modifiée par la période de distribution.

Deux périodes se différencient de manière significative : « avant » et « après » (Figure 16). Si l'on compare les écosystèmes du lait de manière général selon la période on a p-value adonis de 0,02 et la p-value de beta-dispersion de 0,6. Un focus entre deux périodes distinctes, donne que la p-value adonis « avant » - « après » est de 0,002 (Tableau 10). L'écosystème fongique est donc réellement différent entre la période « avant » et la période « après ».

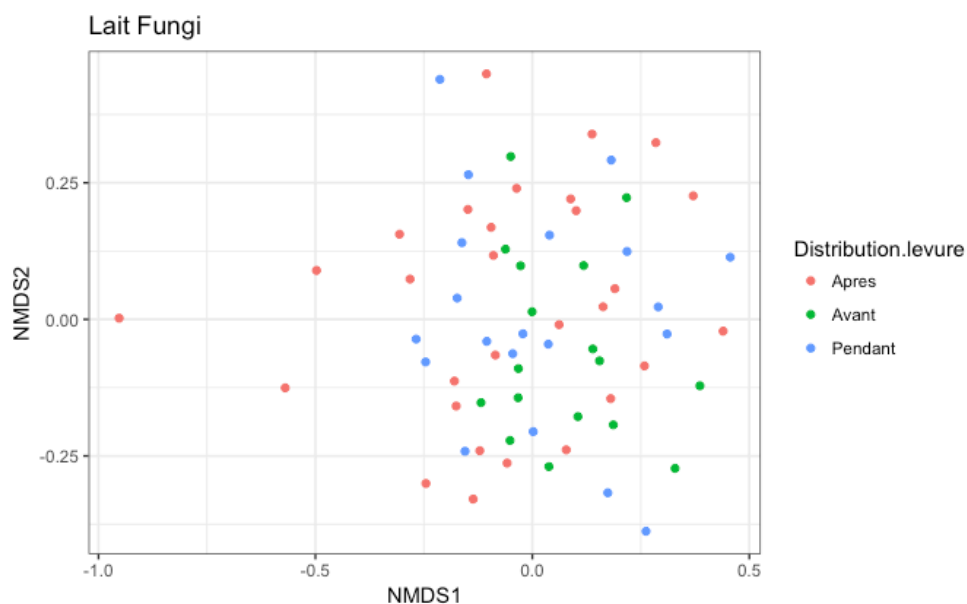


Figure 16 : NMDS, répartitions des points représentatifs de l'écosystème lait selon la période

De même, l'écosystème de l'air est affecté par la période de distribution (p-value adonis : 0,004 et p-value beta-dispersion : 0,58) (Figure 17). Plus précisément, les populations bactériennes de deux périodes se distinguent : « avant » et « après » (p-value adonis 0,001) (Tableau 10).

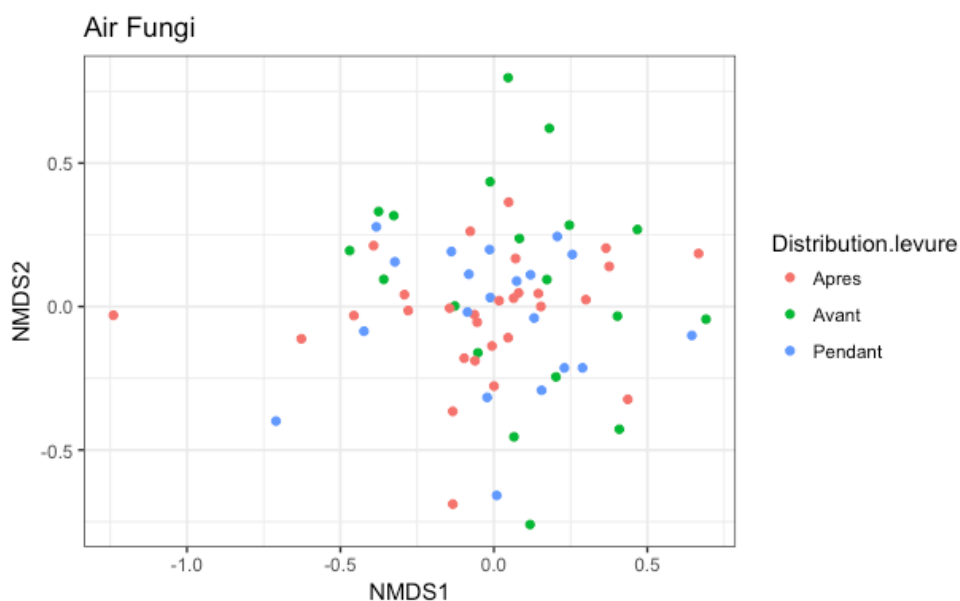


Figure 17 : NMDS, répartition des points représentatifs de l'écosystème air selon la période

Grâce à la PERMANOVA, on identifie que la population fongique est affectée par la période de distribution de levures vivantes au niveau des supports air et lait. Pour ces deux supports, il ressort que la période « avant » distributions est différente de la période « après » distribution.

En ce qui concerne la population fongique de la bouse et des trayons, la période de distribution n'a aucun impact sur ces populations (ANNEXE 7 : Représentation NMDS et PERMANOVA associées, pour la population fongique), alors que ce sont les deux seuls supports où les levures vivantes Sc47 sont retrouvées. On peut faire l'hypothèse d'une très faible quantité, ce qui est corroboré par le LDA support bouse.

8 DISCUSSION

8.1 Complémentarité des différentes approches

L'utilisation de différentes techniques d'analyses (dénombrement de colonies, PCR et métabarcoding) nous a permis de répondre aux deux questions posées ainsi que d'approfondir les résultats trouvés avec la technique la plus simple, le dénombrement.

La première étape a été d'identifier par dénombrement l'impact de la distribution de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières sur le niveau de certains micro-organismes (germes totaux, levures, moisissure et SC). Cette technique est historiquement utilisée pour travailler sur la flore du lait cru. En utilisant des géloses spécifiques de certaines familles, il est possible de vérifier leur présence et de les dénombrer.

La deuxième étape (métabarcoding) nous a permis, dans un premier temps, d'identifier la présence de SC sur les différents supports (même à très faible niveau). Dans un deuxième temps, nous avons pu objectiver les modifications des écosystèmes des différents supports prélevés en fonction de la période de distribution de la levure Sc47.

La troisième étape, nous a permis d'identifier précisément la présence ou non de la levures Sc47, distribuée dans l'alimentation, sur les différents supports prélevés (PCR et identification).

L'analyse moléculaire était d'autant plus essentielle que le processus de collecte inactive un certain nombre de bactéries. En effet, seulement 1% des micro-organismes sont encore cultivables après un prélèvement d'air via un Coriolis (Tang 2009), alors que les micro-organismes même morts sont détectables par PCR puisque c'est l'ADN qui est quantifié.

8.2 Complémentarité des différentes analyses et effet de la distribution des levures vivantes Actisaf® Sc47 sur la dynamique des écosystèmes du lait cru et de ses réservoirs

Il est essentiel ici de bien faire la distinction d'échelle à laquelle on observe l'écosystème.

Les indices de diversités alpha se concentrent sur une petite échelle de l'écosystème, ils se focalisent sur un certain type d'OTU ; les OTUs rares pour certains, les OTUs abondants pour d'autres.

Au contraire de la PERMANOVA, qui elle, s'intéresse à un niveau beaucoup plus global des modifications des écosystèmes.

L'écosystème bouse contient bien des SC en faible quantité lors de la période de distribution de levures Sc47, ce qui est corroboré par l'identification de la souche distribuée et le résultat de l'analyse LDA. L'écosystème bactérien de la bouse est impacté par la période de distribution. En effet, les OTUs dominants et rares sont représentés de manière plus homogène « après » par rapport à « avant ». Ce résultat peut-être rapproché des résultats de Alzahal et al (2017), qui montrent que l'ajout de levures dans l'alimentation affecte principalement les OTUs dominants de la flore ruminale bactérienne. La bouse est le résultat du travail du tube digestif à partir du substrat présent dans le rumen. Il est donc cohérent que nos résultats soient un peu différents des résultats de cette étude. D'autant plus que d'après une communication personnelle, l'impact dominant de l'ajout de levure pourrait se trouver dans le caecum, lieu fortement impacté par l'acidose, et non dans le rumen.

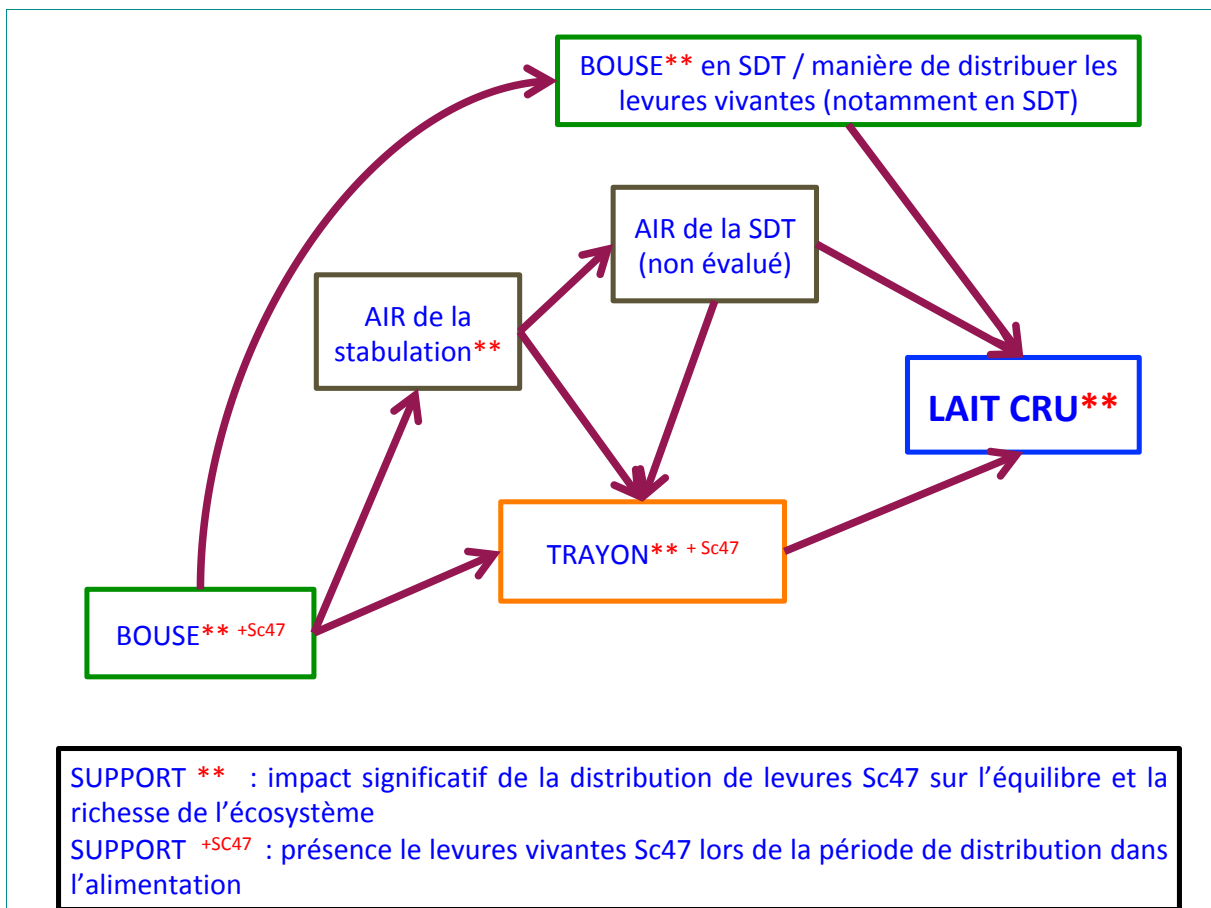


Figure 18 Impacts microbiologiques de la distribution de levures vivantes Sc47 dans l'alimentation des vaches laitières : impacts sur les flores des différents réservoirs de flore du lait cru et flux de flore entre les réservoirs

Au contraire de la bouse et des trayons, la population fongique des supports air et lait est affectée par la période de distribution (PERMANOVA). On a donc une population fongique « avant » distribution significativement différente de la population fongique « après » distribution. La question est de savoir à quoi est due cette différence ? Est-ce bien à cause de l'incorporation de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières ou est-ce un problème de saisonnalité ? On peut envisager une contamination du lait par de l'air de printemps plus humide ce qui affecterait le milieu en fin d'expérimentation (avril).

Pour aller plus loin et étudier l'impact réel de la distribution de levure sur l'écosystème de l'air, on peut s'intéresser au facteur « numéro de prélèvement » (1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7) pour être plus précis que le facteur « distribution de levure » (avant, pendant ou après).

Par la PERMANOVA, le numéro de prélèvement n'a pas d'impact sur la population fongique du lait. Au contraire, ce dernier facteur a un impact significatif sur la population fongique de l'air (tableau 11)

Tableau 11 : Impact de la période de distribution de la levure sur l'écosystème fongique de l'air. Pour considérer que l'impact est positif, il faut avoir Adonis p-value < 0,05 et Beta-dispersion p-value >0,05.

| | |
|---|-------------------------------|
| Support Air | Adonis général, p-value 0,04 |
| Facteur : numéro de prélèvement | Beta dispersion, p-value 0,81 |
| Comparaison 2 à 2 des numéros de prélèvements | Adonis 2 à 2 |
| 1-2 | 0,17 |
| 2-3 | 0,86 |
| 3-4 | 0,85 |
| 4-5 | 0,07 |
| 5-6 | 0,22 |
| 6-7 | 0,9 |
| 5-7 | 0,62 |

On voit donc que la rupture se passe entre le prélèvement « pendant » et celui « après ». Il n'y a aucune différence entre les prélèvements réalisés après la période de distribution. Ceci constitue un argument permettant de relativiser l'effet saison et donc de rester concentré sur l'effet propre de la levure vivante.

Au niveau du lait, des différences entre périodes de distribution sont en partie expliquées par la présence de la bactérie du phylum des Actinobacteria et de la famille des Coriobacteriaceae et de l'espèce *Olsenella* lors de la période « pendant ». Cette présence inhabituellement importante fait se différencier la période « pendant » (LDA).

Cette bactérie est une espèce microbienne habituellement identifiée à la surface des trayons. *Olsenella* est une bactérie productrice d'acide lactique impliquée dans l'affinage des fromages (Verdier-Metz, Monsallier, Montel 2012).

8.3 La levure vivante se disperse-t-elle dans les réservoirs des laits crus à partir de l'alimentation des vaches laitières ?

Nous avons vu que la distribution de levures vivantes Sc47 dans l'alimentation entraîne une excrétion fécale de cette levure (exclusivement pendant la période de distribution). On retrouve également la levure Sc47 dans la flore des trayons pendant la période de distribution. Il a été remarqué que la présence de levures vivantes sur les trayons est assez aléatoire, tous les éleveurs ne sont pas concernés à chaque prélèvement. L'absence de levures vivantes dans le lait rejoint les conclusions des études précédemment réalisées sur le sujet (Grilli et al. 2016; Deneufbourg, Tormo 2013).

Or le trayon est considéré comme le réservoir principal de la flore du lait cru (Mallet et al. 2013). Malgré l'absence de levure Sc47 dans le lait pendant la distribution de levures dans l'alimentation, une possible contamination ponctuelle ou plus fréquente du lait cru par la levure Sc47 n'est pas à exclure selon les pratiques d'hygiène de traite.

En temps normal, la levure lorsqu'elle est présente dans le lait ne semble pas se développer. Mais on peut se demander comment elle se comportera dans le fromage, dont les conditions de développements lui sont plus favorables. Comment-va-elle interagir avec les autres levures et les bactéries ?

Il se peut également que les levures ne passent pas dans le lait, comme une partie de la flore des trayons (Montel et al. 2014),.

Le prélèvement de l'ambiance de l'exploitation présente quelques biais. En effet, il n'a pas été pris en compte le moment de distribution du fourrage par rapport au prélèvement d'ambiance (notamment en stabulation entravée). Cela peut fortement faire varier l'écosystème de l'air, surtout en ce qui concerne les champignons.

De plus, le Coriolis a été positionné dans la stabulation libre ou entravée, de manière à ce que le prélèvement soit le plus représentatif possible du bâtiment sans prendre en compte la salle de traite. Or l'air de la salle de traite est considéré comme un réservoir potentiel de flore du lait cru (Michel, Hauwuy, Chamba 2006; Mallet et al. 2013). Bien qu'un flux d'air puisse exister en stabulation libre entre la salle de traite et le reste du bâtiment (Montel, Bouton, Parguel 2012), il aurait été plus judicieux en stabulation libre de positionner au moins une fois le Coriolis dans la salle de traite.

8.4 Perspective en terme de poursuite de l'étude de l'impact des levures vivantes sur l'écosystème

L'étude avait pour objectif d'étudier l'impact microbiologique de la levure. L'intérêt pour l'AFTALP étant de visualiser à l'échelle de toutes les appellations l'impact des levures. L'échantillonnage a donc été réalisé dans cet objectif ; toutes les appellations ont été représentées.

Or, il est visible que la variabilité inter-élevage est très importante (Figure 19). Les pratiques d'alimentation sont différentes ainsi que les pratiques de traite, le logement, le type de bâtiment. Toutes ces particularités ont un impact non négligeable et statistiquement objectivable sur la microflore du lait cru et de ses réservoirs.

Quand elle est présente, la levure représente un très faible pourcentage de l'abondance relative totale. Pour tous les supports, l'impact de la levure est visible à petite échelle (alpha diversité). On peut penser que si l'impact était plus global, le choix d'exploitations si différentes n'aurait pas eu autant d'importance et l'effet aurait largement été visible, et ce, à toutes les échelles de l'écosystème. Dans notre cas, l'effet est mis en évidence que par la diversité alpha (et non la diversité bêta). On peut donc imaginer qu'en ayant choisi des exploitations plus similaires, l'effet réellement attribuable à la levure vivante aurait été plus visible.

On peut donc suggérer une étude similaire à celle réalisé cet hiver si l'on veut mieux caractériser l'impact de la levure (déjà objectivé ici), étude qui regrouperait des exploitations agricoles aux pratiques d'élevage similaires (alimentation, pratiques de traite, logement, type de bâtiment...).

Par ailleurs, on rappelle que si l'utilisation de la levure venait à être autorisée, serions toujours dans la période « pendant ». Or cette étude met en évidence des modifications entre les périodes « avant » et « après ». De plus, le support trayon semble le plus intéressant à appréhender pour appréhender le passage de levures vivantes dans le lait ainsi que pour représenter la flore du lait et ses modifications.

Il aurait donc été intéressant de prolonger la période « pendant » pour voir à plus long terme comment réagit l'écosystème à l'ajout de levures vivantes dans l'alimentation. Les modifications de l'écosystème visualisées « après » distribution sont-elles le fait de la saison, de l'arrêt de la distribution ou l'inertie de la modification de l'écosystème par les levures vivantes ?

8.5 Perspective quant à la poursuite de l'analyse de la banque de données créés pendant l'étude

Lorsque l'on compare les données grâce à une PERMANOVA, il est statistiquement démontré que la période de distribution n'a aucun impact sur la population bactérienne pour les quatre supports prélevés.

Au contraire, le producteur a un impact significatif sur la structure de la population bactérienne mais aussi fongique.

On voit par exemple que la répartition des points NMDS de l'écosystème fongique du support trayon n'est pas géré par la période de distribution mais par le numéro de l'élevage (Figure 19).

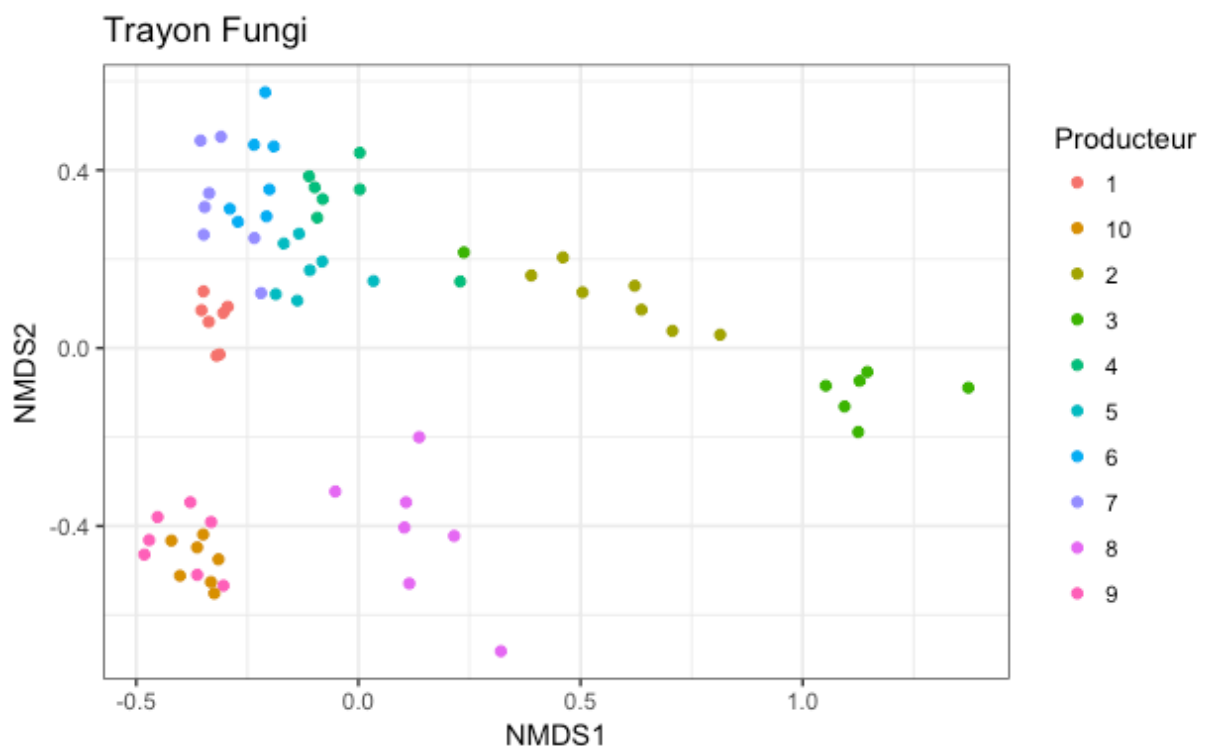
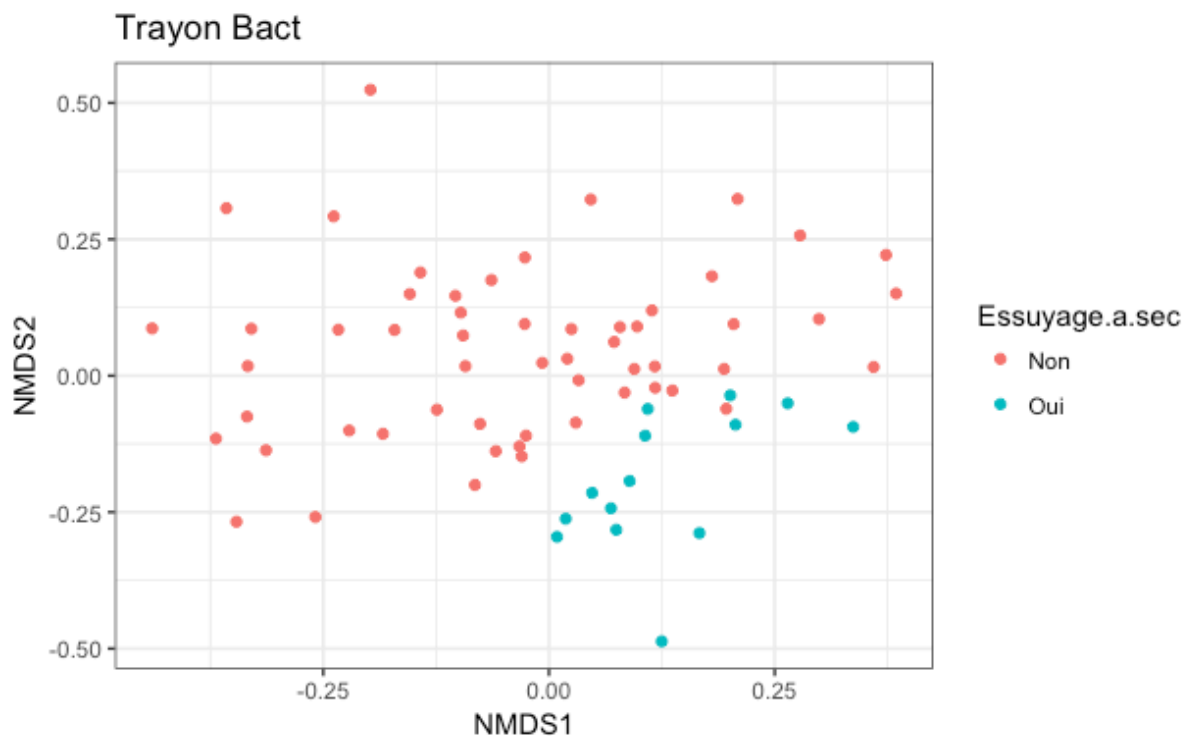


Figure 19 NMDS, positionnement des écosystèmes fongiques du support trayon selon le numéro du producteur pour tous les points de prélèvement, Impact numéro producteur : adonis, p-value = 0,001 et beta dispersion, p-value = 0,837

Le producteur a également un impact sur la population bactérienne et fongique du trayon, de la bouse, de l'air et du lait. Le producteur a un impact sur la flore du lait cru et de ses réservoirs.

La flore est donc spécifique à l'exploitation.

On voit aussi que les pratiques d'hygiène de traite ont un impact sur l'écosystème bactérien du support de flore trayon et lait (Figure 20)



[Figure 20: NMDS, positionnement des écosystèmes fongiques du support trayon selon que l'essuyage à sec est pratiqué pendant la traite, Impact « essuyage à sec » : adonis, p-value = 0,001 et beta dispersion, p-value = 0,26.](#)

On voit donc que grâce aux échantillons récoltés et analysés, nous avons maintenant en notre possession une base de données très riche et complexe.

A première vue, une belle analyse statistique est à prévoir afin d'exploiter ces données. Pour, par exemple, caractériser les écosystèmes microbiens selon les pratiques des éleveurs ; une caractérisation très précise pourra être faite ce qui n'avait jamais été possible auparavant. Cela est maintenant permis par l'utilisation d'outils scientifiques (métabarcoding, PCR) récents.

Cependant, nous avons dans notre échantillon peu d'éleveurs de chaque type. Il serait donc intéressant de prélever dans plus d'élevages pour réellement pouvoir tirer des conclusions des différences observées.

Même si des différences sont observées, il va être compliqué pour le moment de les interpréter selon leurs pratiques. En effet, les repères que nous avons pour le moment concernant la flore des laits crus sont dépassés. Nous ne travaillons plus à la même échelle. Il va donc falloir refaire des repères pour utiliser au mieux les nouvelles technologies et espérer comprendre et savoir interpréter les modifications de l'écosystème influencé par les pratiques de traite par exemple.

Toutes les recherches actuelles concernant la flore du lait cru utilisent ces technologies. Il va donc être bénéfique à toutes les équipes de recherche de pouvoir croiser les résultats et de discuter des avancées.

De récentes publications commencent à établir des profils dominants concernant la flore bactérienne depuis le lait jusqu'au fromage.

Au contraire des résultats présentés ici, il est annoncé que la diversité de la flore augmente de la flore des trayons au fromage (Frétin et al. 2018). Bien que n'étant pas allée jusqu'au fromage lors de cette étude, on a une richesse et une équitabilité qui diminuent de la flore des trayons à la flore du lait cru.

Cependant les phylum prédominants retrouvés dans le lait et sur les trayons dans cette étude sont en accord avec les nouveaux résultats ; on a donc le phylum des Firmicutes (avec OTUs *Aerococcus*, *Clostridiales*, *Jeotgalicoccus psychrophilus* ou encore *Sporobacter* et *Staphylococcus*) puis le phylum des Proteobacteria (avec les OTUs *Acinetobacter albanensis* ou *Psychrobacter*) et enfin le phylum des Actinobacteria (avec l'OTUs *Corynebacterium*) (Frétin et al. 2018).

La flore des trayons est plus que jamais mise en avant comme étant le réservoir principal de la flore du lait cru.

La flore des bouses a également été étudié selon la ration (acidogène ou non). Globalement, grâce au métabarcoding, on voit que les phylum principaux qui caractérisent la flore bactérienne des bouses sont très similaire à la flore du lait cru et des trayons : phylum des Firmicutes, des Proteobacteria, des Actinobacteria puis des Bactéroidetes et des Tenericutes. (Mao et al. 2012). Il ressort que la ration (acidogène ou non) impacte la flore bactérienne des bouses et par contamination on peut supposer que cela modifie aussi la flore des trayons (Mao et al. 2012).

En supposant que les élevages qui ont participé à l'étude proposaient aux vaches des rations acidogènes, il est cohérent de trouver un impact de la levure vivante sur la flore des différents réservoirs de flore des laits cru prélevés, la levure vivante jouant le rôle de tampon.

CONCLUSION

Bien que les impacts microbiologiques de la distribution de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières soient encore compliqués à interpréter, on peut formuler quelques conclusions et hypothèses (Figure 19).

Les levures vivantes distribuées dans l'alimentation sont retrouvées lors de la période de distribution dans les supports bouses et trayons. Les levures Sc47 ne sont pas retrouvées dans le lait cru dans cette étude. Le trayon étant le réservoir principal de la flore du lait cru, nous ne pouvons affirmer que les levures vivantes ne se retrouveront jamais dans le lait cru.

La biodiversité des écosystèmes bactériens de la bouse, de l'air et du lait est modifiée de manière significative lors de la période de distribution de levures vivantes à échelle locale (diversité alpha). En effet, les micro-organismes présents dans un écosystème interagissent entre eux, que ce soit de manière positive ou négative. Ainsi, la présence de SC dans les bouses et sur les trayons a une influence sur la population bactérienne ou fongique. On observe également à échelle locale des modifications de l'écosystème bactérien de l'air.

La PERMANOVA (à l'échelle globale de l'écosystème) permet de voir de manière extrêmement précise que l'écosystème fongique du lait est modifié selon la période de distribution de levures Sc47 (on a un écosystème « avant » distribution différent de celui d'« après »). Il en va de même pour le support air. Comme vu précédemment, la question de l'impact réel de la levure se pose ; un effet saison peut être envisagé.

Au niveau du lait, des différences entre périodes de distribution sont en partie expliquées par la présence de la bactérie d'affinage *Olsenella* de la famille des Actinobacteria lors de la période « pendant ». Cette présence inhabituellement importante fait se différencier la période « pendant ».

Les syndicats de chaque AOP/IGP vont maintenant pouvoir faire le choix d'autoriser ou non l'utilisation des levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières.

Afin d'affiner l'interprétation des données de l'étude, il va être essentiel de les comparer aux résultats d'études ultérieures. En effet, l'INRA d'Aurillac est en train d'étudier la flore microbienne du lait cru et de ses réservoirs par approche

métagénomique. Cela va permettre, sans doute, d'identifier plus finement les flores des laits crus et de leurs réservoirs ainsi que de préciser le rôle de différentes bactéries.

D'autres études similaires vont être nécessaires, afin de refaire une base de données plus précise concernant la flore des laits crus.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

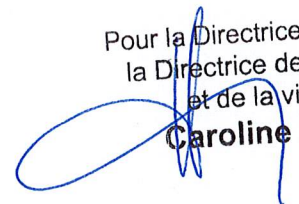
Je soussigné, **Francis ENJALBERT**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Chloé MARCHANDISE** intitulée « **Impact de l'ajout de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières sur la flore des laits crus** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 13 décembre 2018
Professeur **Francis ENJALBERT**
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN

Pour la Directrice et par délégation,
la Directrice de l'enseignement
et de la vie étudiante



Caroline LACROUX

Vu :
Le Président du jury :
Professeur **Florence TREMOLLIÈRES**



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT

Mlle **Chloé MARCAHNDISE**
a été admis(e) sur concours en : 2013
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 04/07/2017
a validé son année d'approfondissement le : 15/11/2018
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

BIBLIOGRAPHIE

ALI HAIMOUD-LEKHAL, D., CHEVAUX, E. et PIRON, A., 2016. *Etude de cas : Evaluation d'un modèle de prédiction de l'effet de Saccharomyces cerevisiae I-1077 sur la production laitière chez la vache*. 2016. Rencontre Recherche et Ruminant.

ALI HAIMOUD-LEKHAL, D. et CHEVAUX, E., 2003. *Effet d'un apport de Levucell SC dans l'alimentation de la vache laitière sur la production et sur la composition du lait*. 2003. Rencontre Recherche et Ruminant.

ALZAHAL, Ousama, LI, Fuyong, GUAN, Le Luo, WALKER, Nicola D. et MCBRIDE, Brian W., 2017. Factors influencing ruminal bacterial community diversity and composition and microbial fibrolytic enzyme abundance in lactating dairy cows with a focus on the role of active dry yeast. *Journal of Dairy Science*. 1 juin 2017. Vol. 100, n° 6, pp. 4377-4393.

BERODIER, A., PARGUEL, P. et CONVERT, Tiphaine, 2013. *Produits nettoyage machine à traire et produits d'hygiène des trayons. Préoccupations des filières fromagères sous SIQO*. 2013. Réseau fromages de terroirs.

BERODIER, A., 2009. *Quelles sont les évolutions de la flore microbienne dans les laits et les fromages?* 2009. Réseau fromages de terroirs.

BEUVIER, Eric, BERTHAUD, Karine, CEGARRA, Sophie, DASEN, André, POCHET, Sylvie, BUCHIN, Solange et DUBOZ, Gabriel, 1997. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *International Dairy Journal*. 1 mai 1997. Vol. 7, n° 5, pp. 311-323.

BEUVIER, Eric et FEUTRY, Fabienne, 2005. Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage.... *Unité de Recherches en Technologie et Analyses laitières*. 2005.

BIJJA, M., DUCOURTIEUX, C. et JULIEN, C., 2014. *Effets de l'addition de produits à base de levures sur les performances zootechniques d'agneaux à l'engraissement*. 2014. Rencontre Recherche et Ruminant.

BONAITI, C., 2004. *Approche dynamique des fonctions et des interactions microbiennes dans un écosystème reconstitué par une méthode d'omission : exemple de l'affinage du fromage de Livarot*. Thèse de Doctorat. Paris : Institut Nationale Agronomique Paris-Grignon.

BOUTON, Y. et GRAPPIN, R., 1995. Comparaison de la qualité de fromages à pâte pressée cuite fabriqués à partir de lait cru ou microfiltré. *Le Lait*. 1995. Vol. 75, n° 1, pp. 31–44.

BOUTON, Y., GUYOT, P., CHAPUIS, D., DUCRET, J. M., BÉRODIER, A. et COURTOT, L., 2012. Influence de la laine de bois comparée à deux méthodes classiques d'hygiène de traite sur la flore microbienne présente à la surface des trayons Influence of wooden wool compared to two classic methods of milking hygiene on the presence of microbial flora on the teat surface. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*. 2012.

BOUTON, Y., TESSIER, L., GUYOT, P. et BEUVIER, E., 2005. Relations entre les pratiques des producteurs et les niveaux de populations microbiennes des laits à Comté Relationships between dairy farmer practices and the levels of microbiological populations in milk used for Comté cheese-making. . 2005.

BOUTON, Y., 2001. Influence de la composition microbiologique du lait sur les caractéristique d'un fromage à pate pressee cuite. *Les Nouvelles du Comté*. 2001. N° 36, pp. 4.

BOUTON, Y., 2009. *Faut-il privilégier la quantité ou la nature de la flore du lait?* 2009. Réseau fromages de terroirs.

BOUTON, Y., 2014. *Groupes microbiens des laits de bovins et facteurs de variation*. 2014. Réseau fromages de terroirs.

BROSSARD, L., MARTIN, C., CHAUCHEYRAS-DURAND, F. et MICHALET-DOREAU, B., 2004. *Effet de l'additif alimentaire Levucell SC (Saccharomyces cerevisiae I-1077) sur le pH ruminal chez le mouton en acidose latente : rôle du schéma expérimental*. 2004. Rencontre Recherche et Ruminant.

BUCHIN, B. et BEUVIER, E., 2000. *La spécificité des fromages au lait cru : le rôle de la microflore naturelle du lait*. 2000. Rencontre Recherche et Ruminant.

CHAUCHEYRAS, Frédérique, FONTY, Gérard, GOUET, Philippe, BERTIN, Gérard et SALMON, Jean-Michel, 1996. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell® SC), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism in vitro. *Canadian Journal of Microbiology*. 1 septembre 1996. Vol. 42, n° 9, pp. 927-933.

- CHIOFALO, V., SCINARDO TENGHI, E., D'AQUINO, S., CHEVAUX, E., PICCITTO, F. et SCIMONELLI, M., 2007. *Effet de l'administration de Saccharomyces cerevisiae active sur la production, composition du lait et aptitude à la transformation du lait en fromage des brebis laitières*. 2007. Rencontre Recherche et Ruminant.
- CHIQUELLE, J., 2009. Evaluation of the protective effect of probiotics fed to dairy cows during a subacute ruminal acidosis challenge. *Animal Feed Science and Technology*. 24 septembre 2009. Vol. 153, n° 3, pp. 278-291.
- CHIQUELLE, J., 2010. Le rôle des probiotiques en production laitière. In : *34e Symposium sur les Bovins laitiers*. Drummondville. 2010.
- CHOLET, Oriane, 2006. *Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire*. Institut Nationale Agronomique Paris-Grignon.
- CLIGNAC, C., 2016. *Evaluation de la pertinence de l'utilisation des « Auxiliaires alimentaires à effet nutritionnel ou zootechnique » dans les exploitations laitières bovines savoyardes et franc-comtoises engagée dans des filières fromagères de qualité*. mémoire de fin d'études d'ingénieur.
- CONVERT, T., 2010. *Flore microbienne en surface des trayons, facteurs de variation en période hivernale*. 2010.
- CONVERT, T., 2012. *Effets-Conjoints, Face au poids de la technologie, quel est le rôle de la microflore du lait cru sur les caractéristiques sensorielles du fromage?* 2012. GIS AlpesJura.
- COULON, JB, MARTIN, B., VERDIER-METZ, I., BUCHIN, S. et VIALON, C., 2000. *Etude du lien entre terroir et produit dans le cas des fromages AOC : influence de la composition floristique des fourrages sur les caractéristiques chimiques et sensorielles des fromages affinés*. 2000. Rencontre Recherche et Ruminant.
- DAHAN, Colette et MINGASSON, Emmanuel, 2016. *Voix Lactée, sur la route du lait*. Dahan Colette et Mingasson Emmanuel. ISBN 978-2-955878-0-5.
- DELABY, L. et PEYRAUD, J. L., 2009. Valoriser les fourrages de l'exploitation pour produire du lait. *Lait*. 2009. Vol. 29, pp. 38.
- DELACROIX-BUCHET, A., LEFIER, D. et NUYTS-PETIT, V., 1992. Polymorphisme de la caseine kappa de trois races bovines françaises et aptitude à la coagulation. *Lait*. 1992. N° 73, pp. 61-72.
- DENEUFBOURG, C. et TORMO, H., 2013. *Evolution de l'impact d'une supplémentation en levure vivante sur la microbiologie du lait cru de vache*. 2013.

DESNOYERS, M., DUVAUX-PONTER, C., BERTIN, G., ROUSSEL, S., TESSIER, J., PIQUEREL, P. et GIGER-REVERDIN, S., 2006. Effets de l'apport de levures (*Saccharomyces cerevisiae* CBS 493.94) sur le comportement et la réactivité émotionnelle de chèvres laitières en acidose sub-clinique Effect of yeast supplementation (*Saccharomyces cerevisiae* CBS 493.94) on behaviour and emotional reactivity of dairy goats in sub-clinical acidosis. *Rencontre Recherche Ruminants*. 2006. Vol. 13, pp. 137.

DESNOYERS, M., GIGER-REVERDIN, S., BERTIN, G., DUVAUX-PONTER, C. et SAUVANT, D., 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *Journal of Dairy Science*. 2009. Vol. 92, n° 4, pp. 1620-1632.

DUBEUF, B. et BURLERAUX, G., 1996. *De la qualification des systèmes de production laitière à la qualification d'un territoire : témoignage sur le cas du Beaufort*. 1996.

FRÉTIN, Marie, MARTIN, Bruno, RIFA, Etienne, ISABELLE, Verdier-Metz, POMIÈS, Dominique, FERLAY, Anne, MONTEL, Marie-Christine et DELBÈS, Céline, 2018. Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. *Scientific Reports* [en ligne]. décembre 2018. Vol. 8, n° 1. [Consulté le 26 novembre 2018]. DOI 10.1038/s41598-017-18447-y. Disponible à l'adresse : <http://www.nature.com/articles/s41598-017-18447-y>

FRETIN, Marie, 2016. *Construction de la qualité sensorielle des fromages de type Cantal : rôle des interactions entre les communautés microbiennes et la composition de la matière grasse laitière des fromages*. Spécialité nutrition et sciences des aliments.

GIGER-REVERDIN, S., BERTIN, G., TESSIER, J. et SAUVANT, D., 2004. *Effet d'une levure (Saccharomyces Cerevisiae CBS 493.94) sur le métabolisme ruminale de la chèvre laitière*. 2004. Rencontre Recherche et Ruminant.

GRILLI, E., TORMO, H., FUSTINI, M., DENEUFBOURG, C., LOSIO, M., FORMIGONI, A., CHAUCHEYRAS-DURAND, F. et DURAND, H., 2016. Short communication Is Raw milk microbiota influenced by the use of live yeast (SC) as ruminant feed additive.pdf. *Journal of Dairy Science*. avril 2016. Vol. 11, n° 3, pp. 124-129.

HASUNUMA, T., UYENO, Y., AKIYAMA, K., HASHIMURA, S., YAMAMOTO, H., YOKOKAWA, H., YAMAGUCHI, T., ITOH, M., MIZUGUCHI, H., SATO, S., HIRAKO, M. et KUSHIBIKI, S., 2016. Consecutive reticular pH monitoring in dairy cows fed diets supplemented with active dry yeast during the transition and mid-lactation periods. *Animal Feed Science and Technology*. 1 novembre 2016. Vol. 221, pp. 215-225.

HUANG, Y., JULIEN, C., MARDEN, J.P et BAYOUEHE, C., 2016. *Analyse quantitative de l'effet des levures vivantes sur le potentiel redox ruminal chez la vache laitière*. 2016. Rencontre Recherche et Ruminant.

INAO, 2007. *Cahier des charges de l'appellation d'origine « Abondance »*. 2007.

INAO, 2012a. *Cahier des charges de l'appellation d'origine « Beaufort »*. 2012.

INAO, 2012b. *Cahier des charges de l'appellation d'origine « Reblochon » ou « Reblochon de Savoie »*. 2012.

INAO, 2015a. *Cahier des charges de l'appellation d'origine « Tome des Bauges »*. 2015.

INAO, 2015b. *Cahier des charges de la dénomination « emmental de Savoie »*. 2015.

INAO, 2015c. *Cahier des charges de la dénomination « Raclette de Savoie »*. 2015.

INAO, 2015d. *Cahier des charges de la dénomination « Tomme de Savoie »*. 2015.

ISHAQ, S.L, ALZAHAL, O., WALKER, Nicola et MCBRIDE, Brian, 2017. An Investigation into Rumen Fungal and Protozoal Diversity in Three Rumen Fractions, during High-Fiber or Grain-Induced Sub-Acute Ruminal Acidosis Conditions, with or without Active Dry Yeast Supplementation. *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 8, n° article 1943.

JOANDELE, E., 2007. *Flore microbienne en surface des trayons, facteurs de variation en période estivale*. 2007.

JOUANY, J. -P., 2006. Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Animal Reproduction Science*. 1 décembre 2006. Vol. 96, n° 3, pp. 250-264.

KAMAL, Reena, DUTT, Triveni, SINGH, Mukesh, KAMRA, Devki Nandan, PATEL, Manjunath, CHOUDHARY, Lal Chandra, AGARWAL, Neeta, KUMAR, Sanjay et ISLAM, Manzarul, 2013. Effect of live *Saccharomyces cerevisiae* (NCDC-49) supplementation on growth performance and rumen fermentation pattern in local goat. *Journal of Applied Animal Research*. 23 septembre 2013. Vol. 45, n° 3, pp. 285-288. world

LAITHIER, C., CALLON, Cecile, DELBES-PAUS, Céline, MONTEL, M. C., MONSALLIER, F., BARRAL, J., PELISSIER, Fanny, PARGUEL, P., RAYNAUD, S., ROUSSEL, P., DESMASURES, Nathalie, BOUTON, Y., BERODIER, A., MICHEL, Valérie, BEUVIER, Eric, DEMARIGNY, Y., SPINLER, Henry-Eric et TORMO, H., 2011. *Microflore du lait cru. Vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation.*

LAMBERT-DERKIMBA, A., MINÉRY, S., BARBAT, A., CASABIANCA, F. et VERRIER, E., 2010. Consequences of the inscription of local breeds in protected designation of origin cow cheese specifications for the genetic management of the herds. *animal*. décembre 2010. Vol. 4, n° 12, pp. 1976-1986.

LE SCOUARNEC, J., GERVAIS, P., DOUCET, D. et MATHON, M., 2006. *Evaluation de l'intérêt d'une levure vivante distribuée pendant les cinq premiers mois de lactation à des chèvres laitières.* 2006. Rencontre Recherche et Ruminant.

LONCKE, C., VAN NESPEN, L., LAUNAY, C., SULMONT, E., PICHON, P. et DEMEY, V., 2012. *Evaluation de l'efficacité d'une complémentation en Saccharomyces cerevisiae CNCM I-1077 sur les performances zootechniques et le comportement alimentaire des taurillons laitiers en début d'engraissement.* 2012. Rencontre Recherche et Ruminant.

LYNCH, Edouard et HARVOIS, France, 2016. *Le Beaufort, réinventer le Fruit Commun.* Libel.

MALLET, A., DELBES-PAUS, C., MONTEL, MC, KAUFFMANN, F., SESBOUE, A., CHESNEAU, C. et DESMASURES, N., 2013. Qualité des laits crus: réservoirs susceptibles d'influencer la diversité microbienne et effets des pratiques de traite. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants.* 2013. pp. 173–176.

MAO, Shengyong, ZHANG, Ruiyang, WANG, Dongsheng et ZHU, Weiyun, 2012. The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows. *BMC Veterinary Research.* 2012. Vol. 8, n° 1, pp. 237.

MARCON, Eric, 2010. *Mesures de la biodiversité.* 2010.

MARTIN, B., BUCHIN, S., HAUWUY, Agnès et LAURENT, P., 2003. *Effet des systèmes de production sur la qualité sensorielle des fromages - Etude à l'échelle d'une coopérative produisant du Beaufort.* 2003. Rencontre Recherche et Ruminant.

MARTIN, B., BUCHIN, S. et HAUWUY, Agnès, 2005. Effet de la nature botanique des pâturages sur les caractéristiques sensorielles du fromage de beaufort. *Sciences des Aliments.* 2005. pp. 67-75.

MICHALET-DOREAU, B. et MORAND, D., 1997. *Influence d'un apport de levures, Saccharomyces cerevisiae Sc I-1077, sur l'évolution des processus fermentaires au cours de la période d'adaptation des ruminants à un régime riche en céréales.* 1997. Rencontre Recherche et Ruminant.

MICHEL, Valérie, CHAMBA, J.F. et HAUWUY, Agnès, 2000. *Caractérisation de la composition microbienne des laits des troupeaux des alpes du nord.* 2000. Rencontre Recherche et Ruminant.

MICHEL, Valérie, HAUWUY, Agnès et CHAMBA, Jean-François, 2001. La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Le Lait.* 2001. Vol. 81, n° 5, pp. 575–592.

MICHEL, Valérie, HAUWUY, Agnès et CHAMBA, J.F., 2006. *Gestion de la flore microbienne des laits crus par les pratiques des producteurs.* 2006. Rencontre Recherche et Ruminant.

MICHEL, Valérie, 2005. *Peut-on agir sur la flore microbienne du lait?* 2005. GIS AdN.

MONSALLIER, Françoise, COUZY, Christelle, CHATELARD-CHAUVIN, Caroline, BOUTON, Yvette, FEUTRY, Fabienne, VERDIER-METZ, Isabelle, HULIN, Sophie et MONTEL, Marie-Christine, 2016. Accompagner les producteurs laitiers pour orienter les équilibres microbiens des laits en faveur de la qualité des fromages au lait cru. *Innovations Agronomiques.* 2016. Vol. 49, pp. 267–279.

MONSALLIER, Françoise, FEUTRY, Fabienne, BOUTON, Yvette, CONVERT, Tiphaine, VERDIER-METZ, Isabelle et MONTEL, Marie-Christine, 2014. Are bedding materials a source of useful microorganisms for dairy cow and ewe milk? *Mountain Pastures, Mediterranean Forage Resources (FAO/SCORENA-CIHEAM) and Mountain Cheese Network.*(109) 2014; *Mountain Pastures, Mediterranean Forage Resources (FAO/SCORENA-CIHEAM) and Mountain Cheese Network, Clermont Ferrand, FRA, 2014-06-24-2014-06-26, 363-363.* 2014.

MONTEL, M. C., BOUTON, Y. et PARGUEL, P., 2012. Ecosystèmes des laits et des fromages au lait cru—Enjeux pour leur maîtrise. *Actes des.* 2012.

MONTEL, M. C., BUCHIN, Solange, MALLET, A., DELBES-PAUS, C., VUITTON, Dominique A, DESMASURES, N. et BERTHIER, Françoise, 2014. Fromage traditionnels bénéfiques associés à la richesse et la diversité de leur microbiote. *Journal of Food Microbiology.* 2014. Vol. 177, pp. 136-154.

PINARD, D., DUEZ, E., FOURDIN, S. et BROCHARD, M., 2014. *Enquêtes auprès de la filière bovine laitière : Quelle place pour les critères de qualité du lait dans les objectifs de sélection?* 2014. Rencontre Recherche et Ruminant.

POPPY, G. D., RABIEE, A. R., LEAN, I. J., SANCHEZ, W. K., DORTON, K. L. et MORLEY, P. S., 2012. A meta-analysis of the effects of feeding yeast culture produced by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on milk production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 1 octobre 2012. Vol. 95, n° 10, pp. 6027-6041.

SEGATA, Nicola, IZARD, Jacques, WALDRON, Levi, GEVERS, Dirk, MIROPOLSKY, Larisa, GARRETT, Wendy S. et HUTTENHOWER, Curtis, 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*. 2011. Vol. 12, n° 60.

TANG, Julian W., 2009. The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *Journal of The Royal Society Interface*. 6 décembre 2009. Vol. 6, n° Suppl 6, pp. S737-S746.

VERDIER-METZ, I., GAGNE, Genevieve, BORNES, Stéphanie, MONSALLIER, F., VEISSIERE, Philippe, DELBES-PAUS, C. et MONTEL, M. C., 2011. Cow teat skin, a potential source of microbial diversity for cheese production. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011.

VERDIER-METZ, I., MONSALLIER, F. et MONTEL, M. C., 2012. Place des pâturages des bovins dans les flux microbiens laitiers. *Fourrages*. 2012. N° 209, pp. 53-58.

VERDIER-METZ, I., PRADEL, P., MONSALLIER, F. et MONTEL, M. C., 2014. *Effect of post-milking treatment on the teat skin and milk microbial diversity of dairy cows*. [Poster]. 2014.

ANNEXE

ANNEXE 1 : Cahier des Charges et Levures Vivantes

ANNEXE 2 : Complément d'information concernant les éleveurs sélectionnés et leurs pratiques

ANNEXE 3 : Représentation NMDS et PERMANOVA associées, pour la population bactérienne

ANNEXE 4 : Représentation NMDS et PERMANOVA associées, pour la population fongique

ANNEXE 1 : Cahier des Charges et Levures Vivantes

Les CDC ont été réalisés pour préserver les qualités des fromages. Ils stipulent les étapes de fabrications du fromage ainsi que des conditions d'élevages (Tableau 1).

Dans les Savoie, le lait utilisé pour fabriquer les fromages n'est pas chauffé au-dessus de 40°C avant l'emprésurage. Ce lait est donc considéré comme du lait cru. Les pathogènes potentiellement présents ne sont pas détruits. Toute la flore présente dans le lait est donc conservée afin de participer à l'élaboration du fromage et à ses qualités organoleptiques.

Il est donc essentiel pour produire des fromages au lait cru de conserver la flore banale du lait cru. Pour cela, les pratiques d'élevage doivent respecter au mieux cette flore (Tableau 1). La contamination par des pathogènes telle que les butyriques est limitée par l'interdiction d'utiliser des fourrages fermentés.

La production laitière est également limitée dans certain AOP pour garder une cohérence entre les ressources fourragères et la production.

Enfin, l'alimentation est très réglementée par les CDC. L'interdiction des fourrages fermentés en lien avec la flore pathogène a déjà été mentionnée. De nombreux travaux ont été réalisés pour mettre en évidence l'importance de l'alimentation des vaches sur les qualités organoleptiques des fromages au lait cru. La quantité de concentrés autorisés l'été et l'hiver est donc réglementée pour les AOP, ainsi que les matières premières autorisées.

L'origine du fourrage, l'affouragement et la possibilité de donner du fourrage l'été sont aussi réglementés. Par exemple en AOP Beaufort, les vaches n'ont accès qu'à de l'herbe pâturée l'été ; la période de transition est de 30 jours sur l'année (période pendant laquelle du foin peut être distribué en même temps que la consommation d'herbe).

La liste positive du CDC nomme les matières premières et les additifs autorisés dans l'alimentation des vaches laitières. Les levures vivantes sont considérées comme des additifs. Elles ne sont pas mentionnées dans la liste positive ; elles sont de ce fait interdites d'utilisation.

Tableau 13 : Cahier des Charges et alimentation

| | Abondance | Beaufort | Reblochon | Tome des Bauges | IGP* |
|---------------------|---|---|--|---|--|
| Races autorisées | Abondance (45% min) Tarine Montbéliarde | Tarine Abondance | Montbéliarde Abondance Tarine | Montbéliarde (max 45%) Abondance Tarine | Tarine Abondance Montbéliarde (autre selon état des lieux de 2002) |
| Pratiques de traite | 2 fois/j pré-trempeage autorisé qu'en cas de présence de staphylocoque lessive désinfectante uniquement en alternance avec acide-alcalin | Pas de pré-trempeage Pas de lessive désinfectante Pas de produit comportant une odeur | 2 fois/j | Produits de désinfection des trayons interdits | Au moins quotidienne Produit alcalin tout les jours et acide 1 fois/s |
| Alimentation | Concentrée et déshydraté | 1800 kg/VL/an 500 kg/UGB génisses/an pas de mélange avec le fourrage haché | 1800 kg/VL/an 500 kg/UGB génisses/an | 1500 kg/VL/an 500 kg/UGB génisses/an | Maxi 45% de la ration en MS |
| | Pâturage | 50% de l'herbe pâturée en été 150j min | Exclusivement de l'herbe durant la période estivale (60j de transition herbe+foin) | 50% de la ration en été, 150j min | Base de l'alimentation en été : 50% de la ration de base durant 150j |
| | Fourrage | Apport de fourrage extérieur à la zone 30% max | Min 75% des besoins en foin et herbe doivent provenir de la zone | Provenance 100% de la zone Sauf exploitation > 600m d'altitude, 75% de la zone | Base de l'alimentation hivernale : fourrage de la zone + complémentation |
| | Affouragement | Autorisé : 1 apport/j maxi été | Interdit | Autorisé : Maïs, herbe, betterave | Autorisé : Maïs/Sorgho ou culture dérobées en vert |
| | Matière première et additif : levure | Aucune mention | Aucune mention | Aucune mention | Aucune mention |
| Pas d'OGM | | | | | |
| Productivité | Fourrage fermentés interdits | | | | |
| | Maxi en fermier : 500 000 kg/an | 5000 kg/VL/an | En fermier max : 500 000 kg/an | 6000 kg/VL/an | Aucune mention |

ANNEXE 2 : Complément d'information concernant les éleveurs sélectionnés et leurs pratiques

Tableau 14 : Modalités de distribution des levures propres à chaque éleveur

| Numéro éleveur | Modalité prélèvement | Distribution par rapport a la traite | Support levure | Incorporation de la levure | Mode de distribution |
|----------------|----------------------|--------------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 101 | Soir | Après | Farine fermière | Pré incorporée | Table d'alimentation cornadis |
| 102 | Matin | Pendant | Ration mélangeuse | Pré incorporée | Table d'alimentation cornadis |
| 103 | Soir | Pendant | Ration mélangeuse | Pré incorporée | Table d'alimentation cornadis |
| 104 | Matin | Après | Ration mélangeuse | Pré incorporée | Table d'alimentation cornadis |
| 105 | Soir | Pendant | Farine fermière | Manuel | Auge individuelle SDT |
| 106 | Matin | Après | Farine fermière | Pré incorporée | DAC Bâtiment |
| 107 | Soir | Avant | Granulés | Manuel | Table d'alimentation cornadis |
| 108 | Matin | Après | Granulés | Manuel | Auge individuelle entravée |
| 109 | Soir | Avant | Granulés | Manuel | Auge individuelle entravée |
| 110 | Matin | Avant | Granulés | Manuel | Auge individuelle entravée |

Tableau 15 : Pratiques de traite propre à chaque éleveur

| Num éleveur | Décro auto | Egouttage manuel | Nétoyage individuel lavette | Essuyage à sec | Nétoyage non individuel | Post trempage | lavage MAT 1 fois par jour | 1er jet |
|-------------|------------|------------------|-----------------------------|----------------|-------------------------|---------------|----------------------------|---------|
| 101 | Non | Oui | Non | Non | Non | Oui | Non | Non |
| 102 | Oui | Non | Non | Non | Oui | Oui | Non | Non |
| 103 | Oui | Non | Non | Non | Non | Oui | Non | Non |
| 104 | Non | Oui | Non | Non | Oui | Oui | Non | Non |
| 105 | Oui | Oui | Oui | Non | Non | Oui | Oui | Oui |
| 106 | Oui | Non | Non | Non | Non | Oui | Non | Non |
| 107 | Oui | Non | Non | Non | Non | Oui | Non | Oui |
| 108 | Non | Oui | Non | Non | Non | Oui | Non | Non |
| 109 | Non | Non | Non | Oui | Non | Non | Oui | Oui |
| 110 | Non | Oui | Non | Oui | Non | Oui | Oui | Oui |

Tableau 16 : Conditions de chaque prélèvement

| Identifiant | Numéro élève | Prélèvement | Date de prélèvement | Distribution levure | Propriété | Ambiance traite | Fréquence des bouses |
|-------------|--------------|-------------|---------------------|---------------------|-----------|-----------------|----------------------|
| 101 1 | 101 | 1 | 02-janv | non | Propriété | Rumine | 0 |
| 102 1 | 102 | 1 | 03-janv | non | Sale | Moyen | 0 |
| 103 1 | 103 | 1 | 03-janv | non | Propriété | Rumine | 5 |
| 104 1 | 104 | 1 | 04-janv | non | Propriété | Rumine | 0 |
| 105 1 | 105 | 1 | 04-janv | non | Propriété | Rumine | 0 |
| 106 1 | 106 | 1 | 05-janv | non | Propriété | Rumine | 5 |
| 107 1 | 107 | 1 | 08-janv | non | Moyen | Rumine | 0 |
| 108 1 | 108 | 1 | 09-janv | non | Moyen | Moyen | 0 |
| 109 1 | 109 | 1 | 09-janv | non | Propriété | Rumine | 0 |
| 110 1 | 110 | 1 | 10-janv | non | Propriété | Rumine | 0 |
| 101 2 | 101 | 2 | 10-janv | non | Propriété | Rumine | 0 |
| 102 2 | 102 | 2 | 11-janv | non | Sale | Moyen | 5 |
| 103 2 | 103 | 2 | 11-janv | non | Propriété | Rumine | 5 |
| 104 2 | 104 | 2 | 12-janv | non | Sale | Stress | 10 |
| 105 2 | 105 | 2 | 15-janv | non | Propriété | Rumine | 0 |
| 106 2 | 106 | 2 | 16-janv | non | Propriété | Rumine | 5 |
| 107 2 | 107 | 2 | 16-janv | non | Moyen | Rumine | 0 |
| 108 2 | 108 | 2 | 17-janv | non | Moyen | Rumine | 0 |
| 109 2 | 109 | 2 | 17-janv | non | Propriété | Rumine | 0 |
| 110 2 | 110 | 2 | 18-janv | non | Propriété | Rumine | 0 |
| 101 3 | 101 | 3 | 31-janv | oui | Propriété | Rumine | 0 |
| 102 3 | 102 | 3 | 01-févr | oui | Sale | Moyen | 5 |
| 103 3 | 103 | 3 | 01-févr | oui | Propriété | Rumine | 5 |
| 104 3 | 104 | 3 | 02-févr | oui | moye | Stress | 10 |

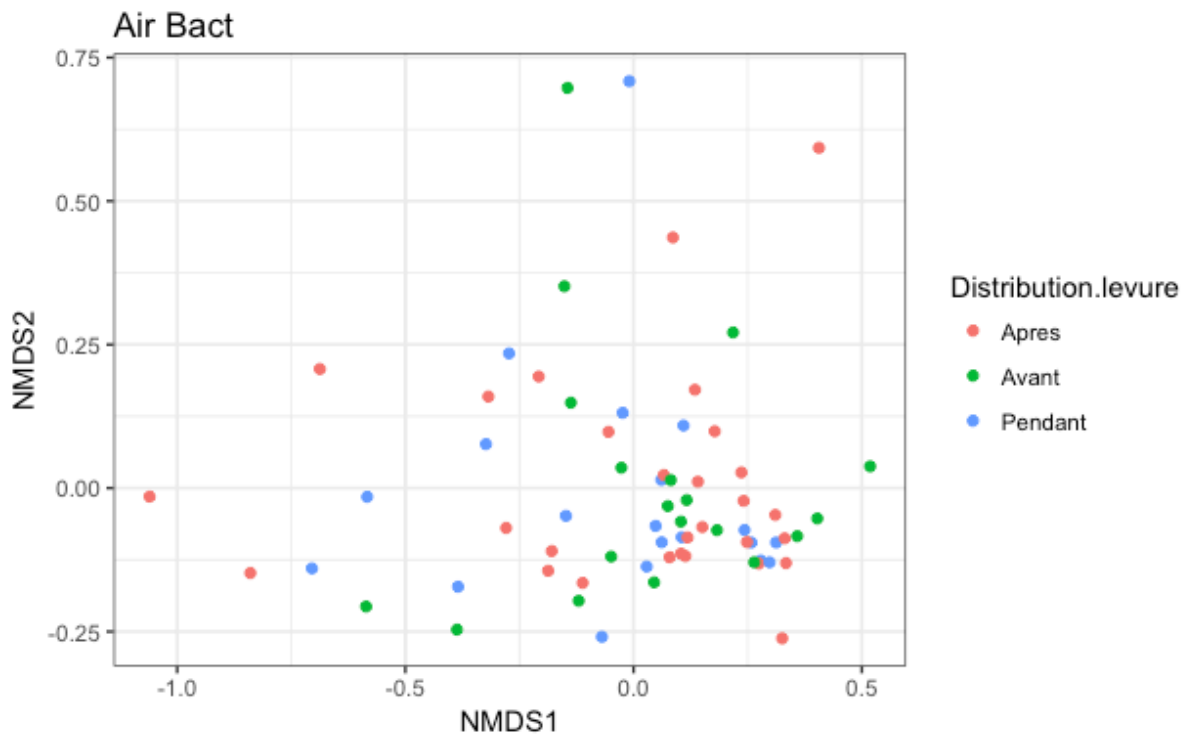
| | | | | | | | |
|-------|-----|---|---------|-----|------------|--------|----|
| | | | | | n | | |
| 105 3 | 105 | 3 | 05-févr | oui | Propr e | Rumine | 0 |
| 106 3 | 106 | 3 | 06-févr | oui | Propr e | Rumine | 5 |
| 107 3 | 107 | 3 | 06-févr | oui | Moye n | Rumine | 0 |
| 108 3 | 108 | 3 | 07-févr | oui | Moye n | Rumine | 0 |
| 109 3 | 109 | 3 | 07-févr | oui | Propr e | Rumine | 0 |
| 110 3 | 110 | 3 | 08-févr | oui | Propr e | Rumine | 0 |
| 101 4 | 101 | 4 | 12-févr | oui | Propr e | Rumine | 0 |
| 102 4 | 102 | 4 | 13-févr | oui | Sale | Moyen | 5 |
| 103 4 | 103 | 4 | 13-févr | oui | Propr e | Rumine | 5 |
| 104 4 | 104 | 4 | 14-févr | oui | moye n | Stess | 10 |
| 105 4 | 105 | 4 | 14-févr | oui | Propr e | Rumine | 0 |
| 106 4 | 106 | 4 | 15-févr | oui | Propr e | Rumine | 5 |
| 107 4 | 107 | 4 | 19-févr | oui | Moye n | Rumine | 0 |
| 108 4 | 108 | 4 | 20-févr | oui | Moye n | Rumine | 0 |
| 109 4 | 109 | 4 | 20-févr | oui | Propr e | Rumine | 0 |
| 110 4 | 110 | 4 | 21-févr | oui | Propr e | Rumine | 0 |
| 101 5 | 101 | 5 | 05-mars | non | Propr e | Rumine | 0 |
| 102 5 | 102 | 5 | 06-mars | non | Sale | Moyen | 5 |
| 103 5 | 103 | 5 | 06-mars | non | Propr e | Stress | 5 |
| 104 5 | 104 | 5 | 07-mars | non | moye n | Stress | 5 |
| 105 5 | 105 | 5 | 07-mars | non | Propr e | Rumine | 0 |
| 106 5 | 106 | 5 | 08-mars | non | Propr e | Rumine | 5 |
| 107 5 | 107 | 5 | 08-mars | non | Moye n | Rumine | 0 |
| 108 5 | 108 | 5 | 09-mars | non | Moye n | Rumine | 0 |

| | | | | | | | |
|-------|-----|---|---------|-----|------------|--------|----|
| 109 5 | 109 | 5 | 12-mars | non | Propr e | Rumine | 0 |
| 110 5 | 110 | 5 | 13-mars | non | Propr e | Rumine | 0 |
| 101 6 | 101 | 6 | 13-mars | non | Propr e | Rumine | 0 |
| 102 6 | 102 | 6 | 14-mars | non | Sale | Moyen | 5 |
| 103 6 | 103 | 6 | 14-mars | non | Propr e | Stress | 5 |
| 104 6 | 104 | 6 | 15-mars | non | moye n | Stress | 5 |
| 105 6 | 105 | 6 | 15-mars | non | Propr e | Rumine | 0 |
| 106 6 | 106 | 6 | 16-mars | non | Propr e | Rumine | 5 |
| 107 6 | 107 | 6 | 19-mars | non | Moye n | Rumine | 0 |
| 108 6 | 108 | 6 | 20-mars | non | Moye n | Rumine | 0 |
| 109 6 | 109 | 6 | 20-mars | non | Propr e | Rumine | 0 |
| 110 6 | 110 | 6 | 21-mars | non | Propr e | Rumine | 0 |
| 101 7 | 101 | 7 | 21-mars | non | Propr e | Rumine | 0 |
| 102 7 | 102 | 7 | 22-mars | non | Sale | Stress | 10 |
| 103 7 | 103 | 7 | 22-mars | non | Propr e | Stress | 5 |
| 104 7 | 104 | 7 | 23-mars | non | Propr e | Moyen | 0 |
| 105 7 | 105 | 7 | 26-mars | non | Moye n | Rumine | 0 |
| 106 7 | 106 | 7 | 27-mars | non | Propr e | Rumine | 5 |
| 107 7 | 107 | 7 | 27-mars | non | Moye n | Rumine | 0 |
| 108 7 | 108 | 7 | 28-mars | non | Moye n | Stress | 10 |
| 109 7 | 109 | 7 | 28-mars | non | Propr e | Rumine | 0 |
| 110 7 | 110 | 7 | 29-mars | non | Propr e | Rumine | 0 |

ANNEXE 3 : Représentation NMDS et PERMANOVA associées, pour la population bactérienne

1. Bactéries

a. Support Air



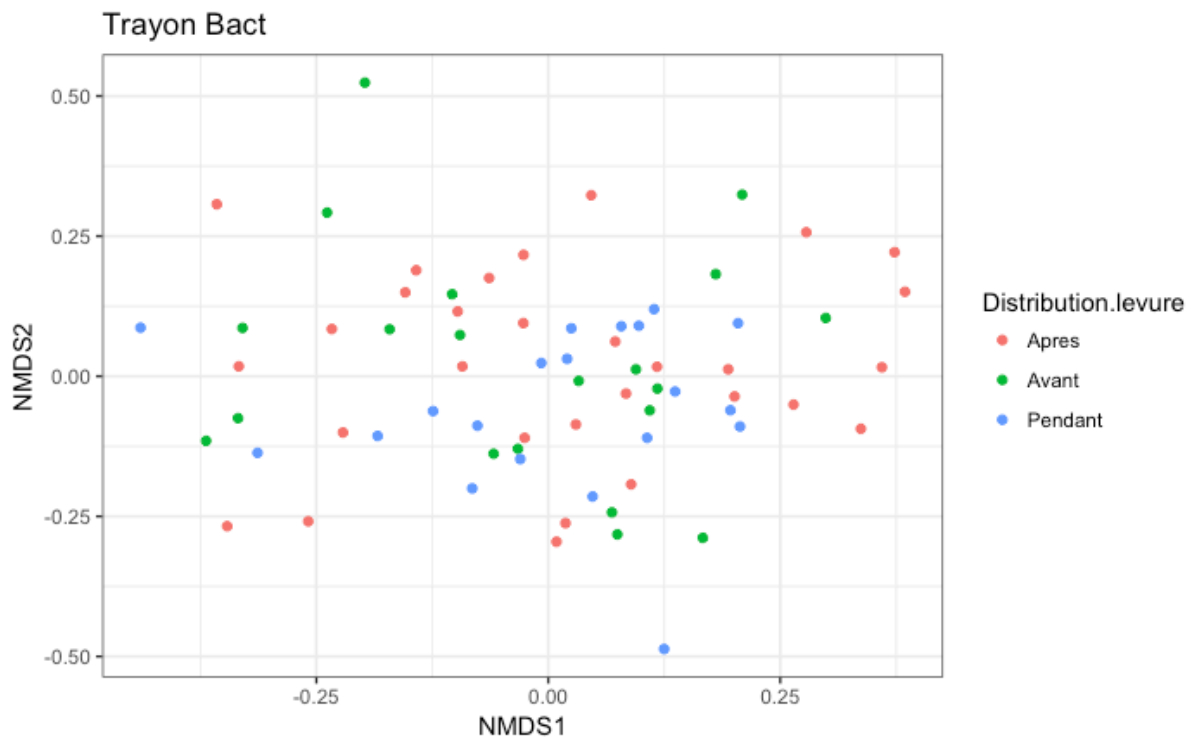
[Figure 21 : Représentation NMDS des bactéries des prélèvements d'air selon la période de distribution](#)

PERMANOVA associée :

- Adonis, p-value = 0,75
- Beta dispersion, p-value = 0,892

➔ Résultat non significatif, la période n'affecte pas la population bactérienne des supports de flore Air.

b. Support Trayon



[Figure 22: Représentation NMDS des bactéries des prélèvement sur trayon selon la période de distribution](#)

PERMANOVA associée :

- adonis, p-value = 0,26
- beta-dispersion, p-value = 0,68

➔ Résultat non significatif, la période n'affecte pas la population bactérienne des supports de flore Trayon.

c. Support Bouse

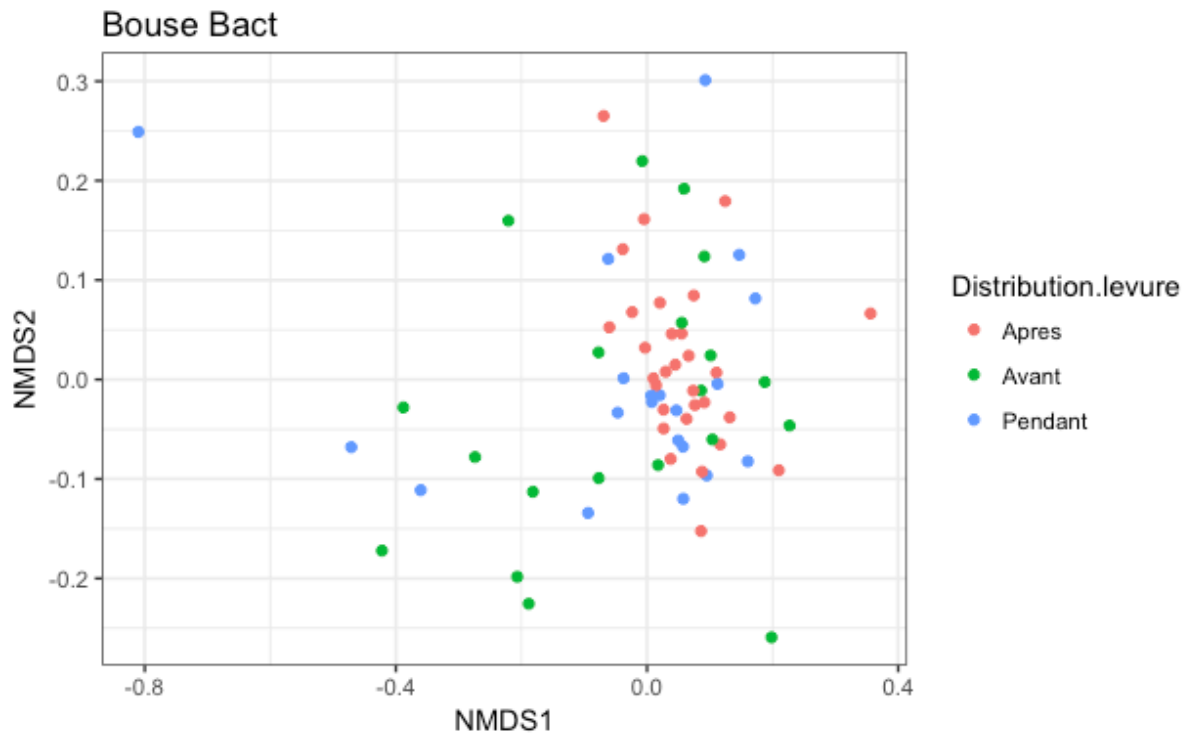


Figure 23: Représentation des bactéries des prélèvements de bouse selon la période de distribution

PERMANOVA associée :

- Adonis, p-value = 0,265
- Beta dispersion, p-value = 0,054

→ Résultat non significatif, la période n'affecte pas la population bactérienne des supports de flore Bouse

d. Support Lait

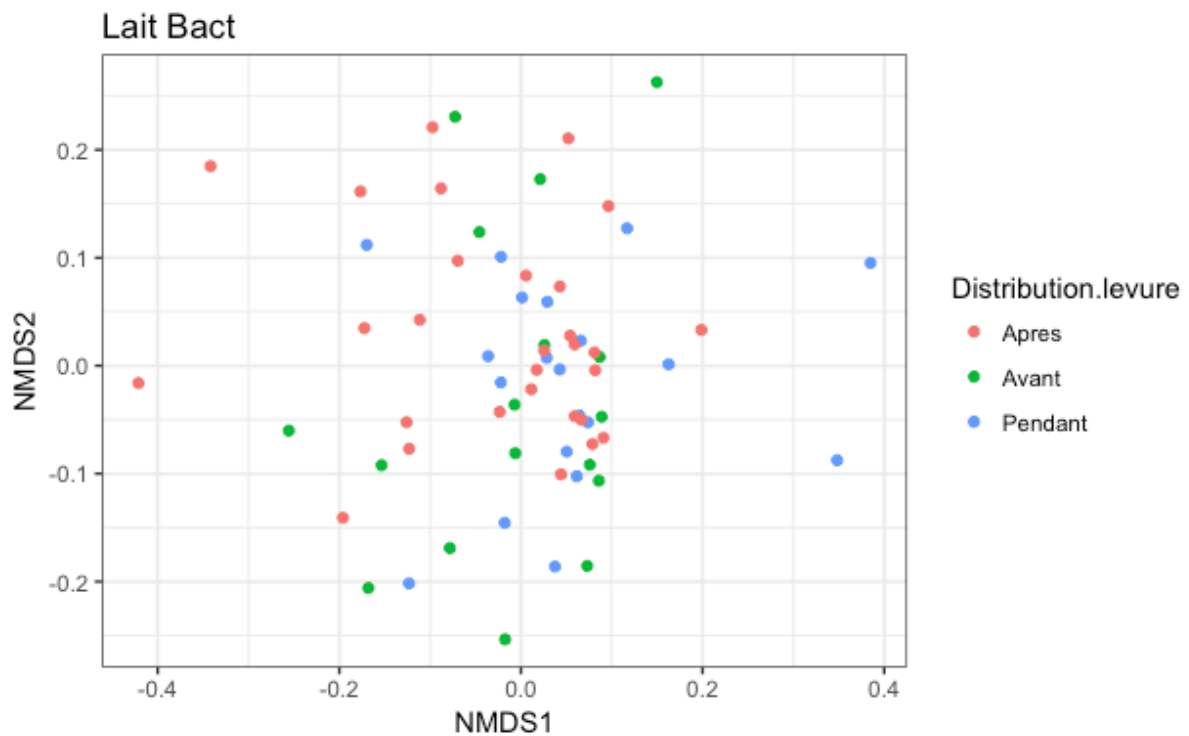


Figure 24 : Représentation NMDS des bactéries des prélèvements de lait selon la période de distribution

PERMANOVA associée :

- Adonis, p-value = 0,313
- Beta dispersion, p-value = 0,46

→ Résultat non significatif, la période n'affecte pas la population bactérienne des supports de flore Lait

ANNEXE 4 : Représentation NMDS et PERMANOVA associées, pour la population
fongique

a. Support Air

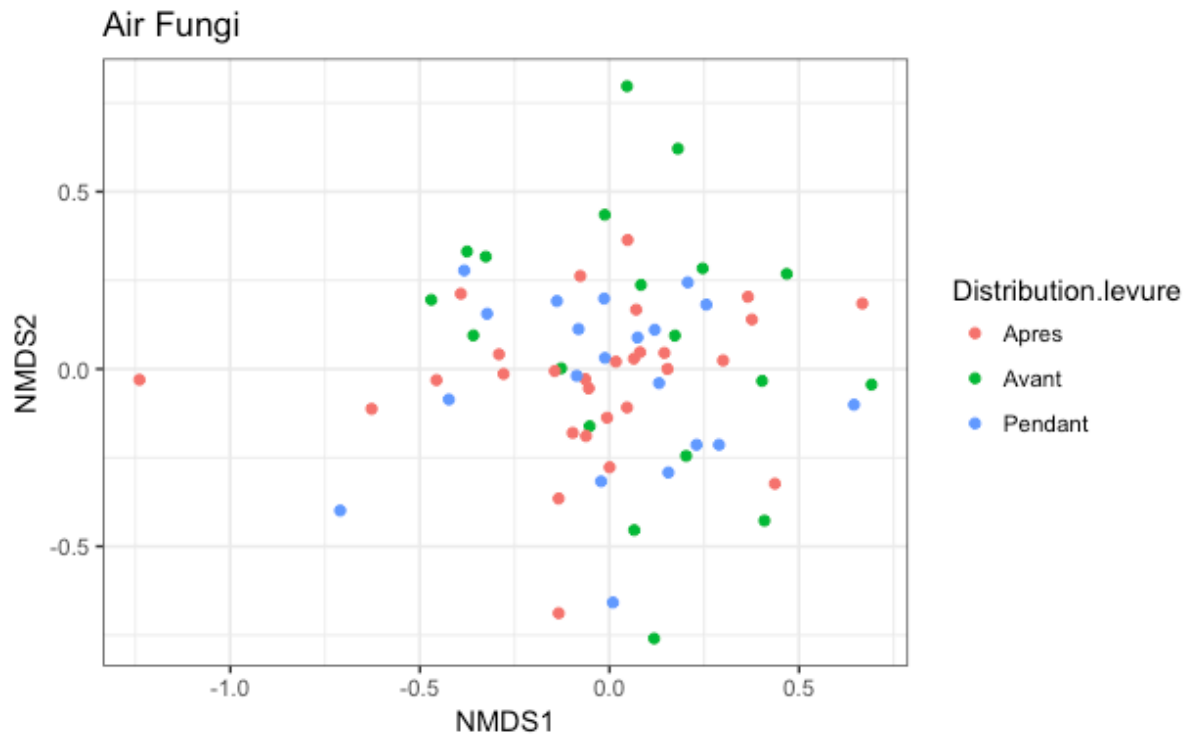


Figure 25 : Représentation NMDS des champignons des prélèvements d'air selon la période

PERMANOVA associée :

- Adonis, p-value = 0,004
- Beta dispersion, p-value = 0,58

→ Effet significatif de la période de distribution sur l'écosystème fongique.

ADONIS particulier, comparaison des périodes :

- Av-pt : 0,154
- **Av-ap : 0,001**
- Pt-ap : 0,147

→ On a donc deux états différents de l'écosystème fongique : avant et après.

b. Support Bouse

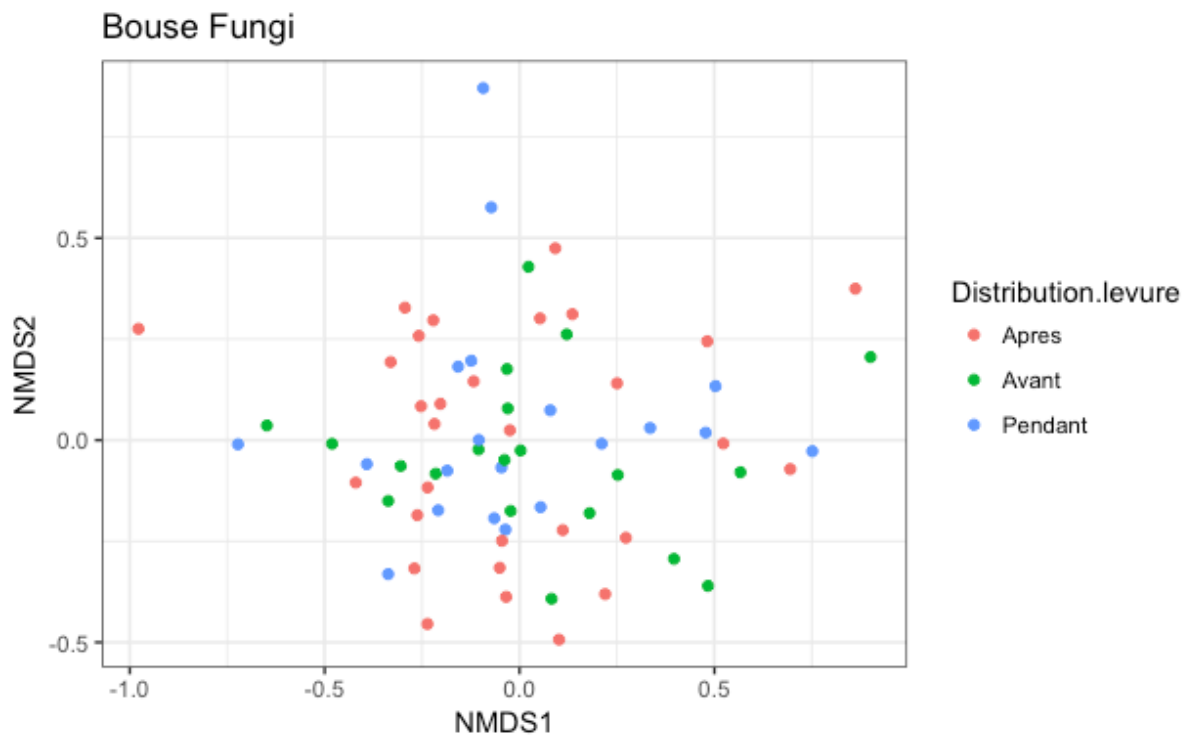


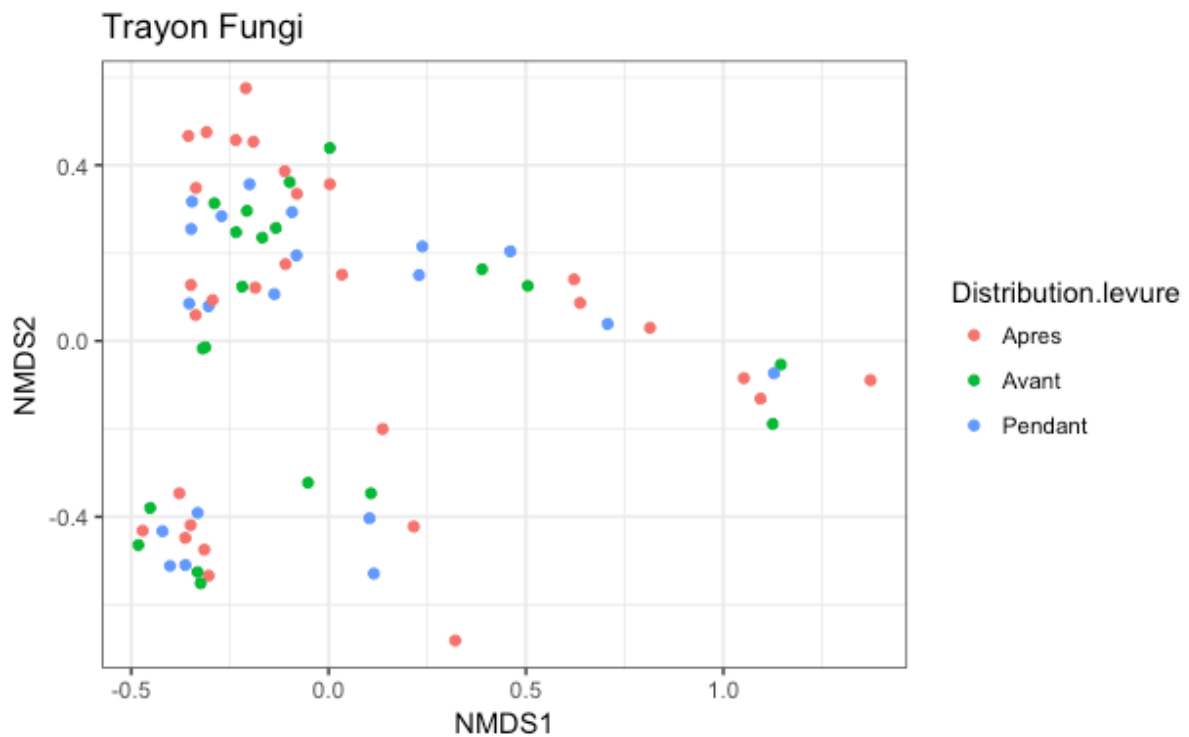
Figure 26 : Représentation NMDS des champignons des prélèvements de bouse selon la période de distribution

PERMANOVA associés :

- Adonis, p-value = 0,158
- Beta-dispersion, p-value = 0,78

→ Résultat non significatif, la période n'affecte pas la population fongique des supports de flore Bouse

c. Support Trayon



[Figure 27 : Représentation NMDS des champignons des prélèvements sur trayon selon la période](#)

PERMANOVA associée :

- Adonis, p-value = 0,93
- Beta dispersion, p-value = 0,98

➔ Résultat non significatif, la période n'affecte pas la population fongique des supports de flore Trayon

d. Support Lait

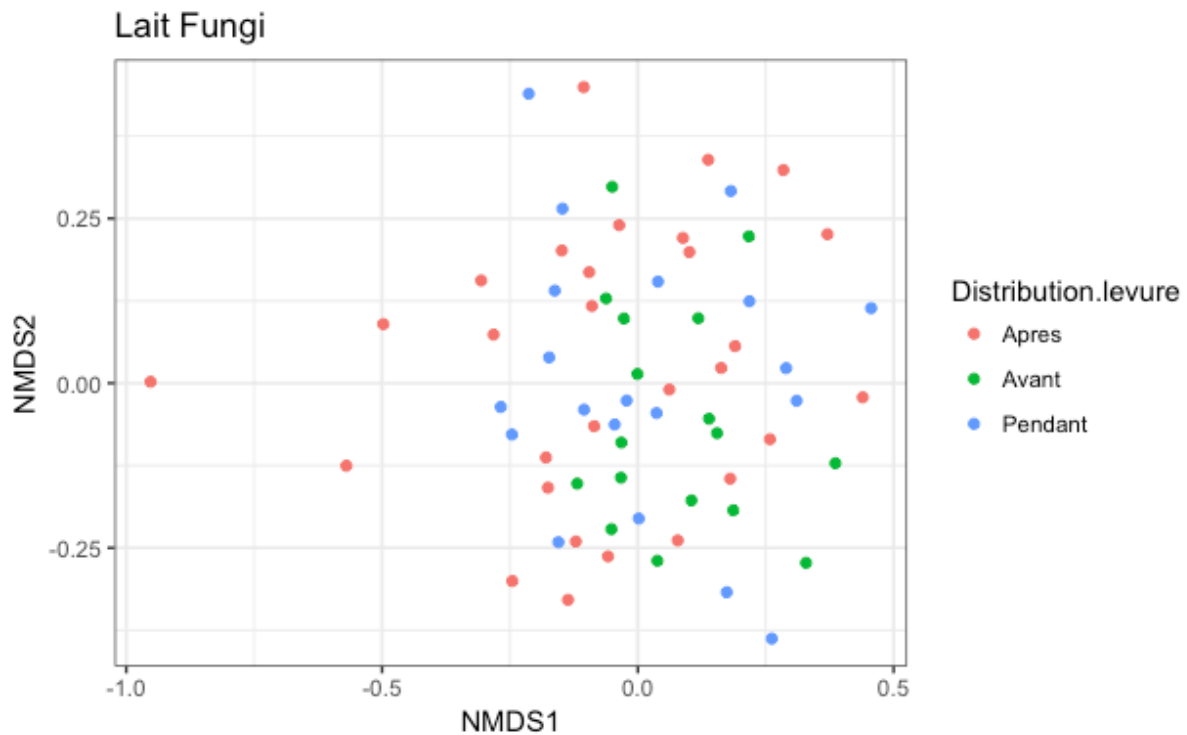


Figure 28 : Représentation NMDS des champignons des prélèvements de lait selon la période

PERMANOVA associée :

- Adonis, p-value = 0,02
- Beta-dispersion, p-value = 0,59

→ Effet significatif de la période de distribution sur l'écosystème fongique.

ADONIS particulier, comparaison des périodes :

- Av-pt : 0,109
- Av-ap : 0,002
- Pt-ap : 0,263

→ On a donc deux états différents de l'écosystème fongique : avant et après.

Titre : Impact de l'ajout de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières sur la flore des laits crus

Résumé

Les levures font partie de l'équilibre naturel des écosystèmes du lait cru. Lors d'un état des lieux sur l'utilisation d'additifs dans l'alimentation des vaches laitières, l'utilisation de levures vivantes a été mise en évidence hors cahiers des charges.

Cette étude a pour but de mettre en évidence les éventuelles conséquences microbiologiques de la distribution de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) dans l'alimentation des vaches laitières.

Au cours de l'hiver 2017-2018, dix exploitations réparties au sein de différentes filières fromagères (AOP Abondance, Beaufort, Reblochon et Gruyère de France, IGP Emmental et Tomme de Savoie) ont été suivies.

Des levures vivantes ont ainsi été ajoutées dans l'alimentation de vaches laitières pendant 4 à 5 semaines. Avant, pendant et après distribution, divers prélèvements ont été réalisés sur le lait, sur trayon, dans les bouses et dans l'air, afin de détecter l'éventuelle présence de levures et d'apprécier leur rémanence suite à l'arrêt de distribution.

Les prélèvements ont été analysés par le laboratoire ACTALIA pour identifier avec précision les flores présentes (bactériologie simple sur gélose spécifique ; extraction et identification de l'ADN par métabarcoding).

Les résultats sont qu'au moment de la distribution, les levures sont retrouvées sur le trayon, réservoir principal de la flore, ainsi que dans les bouses. Puis d'une manière générale, la présence des levures s'estompe après l'arrêt de distribution.

L'impact des levures vivantes sur l'équilibre de la microflore du lait cru a été analysé par métabarcoding : la période de distribution influe sur les indices caractérisant la diversité de la microflore. Cependant, cette méthode d'analyse étant récente, il existe encore peu de bases de données et de valeurs de références. Il est donc délicat d'interpréter finement ces résultats.

Mots-clés : levures vivantes, *Saccharomyces cerevisiae*, alimentation vache laitière, lait cru, équilibre microbien, flore du lait cru

Title: Effect of live *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on microbial balance of raw milk

Summary

Live *Saccharomyces cerevisiae* belong to natural balance of the raw milk. During a study about the use of additive in cow food was underlined the use of live *Saccharomyces cerevisiae*, without specifications.

This study aims to show the possible microbiological consequences of yeast supplementation in dairy cow diet.

During the winter 2017-2018, ten dairy farms giving different cheeses in Savoie / Haute-Savoie (Abondance, Beaufort, Reblochon, Gruyère de Savoie and Emmental, Tomme de Savoie) were followed. Live yeast were hadded in the dairy cow diet during 4-5 weeks. Before, during and after delivery, samples of raw milk, teat skin, feces and air were made in order to detect the possible presence of live yeasts and to appreciate their persistence.

Samples were analysed by ACTALIA to identify precisely the microbial diversity (bacteriology, extraction and identification of DNA by metabarcoding).

The results are that during the delivery of live yeasts, yeasts were found on the teat skin, main source of bacteria, and in feces. Then generally speaking, the presence falls down after the stop of delivery.

The impact of live yeasts on the balance of microflore of raw milk was analysed by metabarcoding: the delivery period has an influence on indicator charactering the microbial diversity.

However, this kind of analysis is a recent one, there are very few data and references values. For this raison, to interpret subtly those results remains difficult.

Key words: live yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, dairy cow supplementation, raw milk, microbial balance, flora of raw milk