

## Levures vivantes en alimentation animale

Lors d'un état des lieux réalisé en 2016, la distribution de levures vivantes dans l'alimentation des vaches laitières a été mise en évidence sur un certain nombre d'exploitations des zones IGP/AOP de Savoie. Cette pratique est, pour l'instant, non autorisée par les cahiers des charges, en dehors des prescriptions vétérinaires.

Quelque soit le distributeur de levure, la souche utilisée appartient à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, notée par la suite Sc.

Avant de statuer sur l'opportunité d'autoriser cette distribution, reconnue pour ses effets zootechniques, l'Aftalp souhaite vérifier les effets de cette distribution d'un point de vue microbiologique, l'équilibre microbien au sein des exploitations et du lait étant effectivement un facteur clé des filières fromagères au lait cru.

Pour cela, une expérimentation a été mise en œuvre au cours de l'hiver 2017-2018, en partenariat avec la société **Phileo**-Lesaffre et les organismes techniques présents en Savoie (Éleveurs des Savoie, Actalia, GTV).

**L'objectif de l'expérimentation était de statuer sur l'influence d'une distribution de levures vivantes sur :**

- La présence de la souche distribuée dans l'environnement de l'exploitation et son passage éventuel dans le lait,
- La stabilité de l'équilibre microbien de l'environnement et du lait.

Pour construire l'expérimentation, 3 points de vigilance nous ont guidés :

1°) Avoir un protocole suffisamment **robuste**, pour permettre de conclure :

*Ceci suppose d'avoir un nombre important de répétitions pour être en mesure de faire des traitements statistiques et nécessite de rechercher des financements et surtout d'avoir une personne dédiée pour les prélèvements.*

*Nous remercions le Pep Bovin Lait et le Conseil Départemental de Savoie qui nous ont apporté leur soutien financier et Chloé Marchandise qui a mis en œuvre l'expérimentation dans le cadre de sa thèse Vétérinaire.*

2°) Être en capacité de **suivre** la souche distribuée de **façon fiable** :

*Seuls les propriétaires de la souche étant en mesure de l'identifier parfaitement, il nous fallait travailler en partenariat avec un distributeur intéressé par l'étude. Nous avons ainsi créé un partenariat avec la société **Phileo**-Lesaffre, qui produit l'Actisaf, contenant la souche SC 47,*

3°) Avoir une description suffisamment **fine des équilibres microbiens** :

*Pour vérifier si les équilibres microbiens sont modifiés, il est nécessaire d'être en capacité de les décrire finement. Par analyse bactériologiques classique, cela aurait nécessité de faire un grand nombre d'analyses. Nous avons ainsi décidé de faire des analyses par Métabarcoding (c'est-à-dire par séquençage de l'ADN de tous les micro-organismes présents dans un échantillon). Cette technique est encore peu utilisée sur ce type d'échantillons ; de ce fait, nous disposons de très peu de données auxquelles comparer nos résultats.*

### Quelques éléments du protocole :

Dans la mesure où nous souhaitons étudier l'ambiance des étables, il n'était pas possible de faire deux lots d'animaux dans une même exploitation ou de comparer deux exploitations, l'une avec distribution, l'autre sans. Nous avons ainsi choisi de mener une expérimentation de type : Avant / Pendant / Après :

- La phase « Avant » permet d'avoir un témoin,
- La phase « Pendant » correspond à la période de distribution de la levure aux vaches laitières : elle **doit être** suffisamment longue pour être sûr que l'effet se manifeste, si effet il y a (5 semaines)
- La phase « Après » correspond à une période sans distribution, pour vérifier si l'effet éventuellement observé se maintient et sur quelle durée (6 semaines).

10 exploitations volontaires, réparties sur les différentes zones IGP et AOP des Savoie ont été suivies.

Au cours de la période « Pendant », les vaches laitières recevaient 5 gr de levure par jour, correspondant à **50 milliards d'UFC/VL/jour**, dose **préconisée par le fabricant** pour la distribution de levure.

Dans chacune des exploitations, 7 séries de prélèvements ont été réalisées (respectivement 2, 2 et 3 au cours des périodes Avant, Pendant et Après), sur :

- Les bouses, l'air et la surface des trayons pour décrire l'ambiance de l'exploitation
- Et le lait pour vérifier son éventuelle contamination.

### Présence de l'espèce SC dans l'environnement ou le lait ?

Pendant les périodes hors distribution (avant et après), il est détecté, parmi l'ensemble des espèces de levures ou moisissures présentes, la présence de l'espèce SC dans 1 échantillon sur 5, aussi bien d'air, sur trayon ou dans le lait à des niveaux très faibles (inférieur à 1 % des levures) : l'espèce SC est donc présente en faible quantité dans l'environnement des exploitations.

Pendant la période « Pendant », la présence de l'espèce SC est détectée, dans :

- 3 échantillons sur 4 dans les bouses
- 1 échantillon sur 2 sur les trayons,
- 1 échantillon sur 5 dans l'air et le lait, comme pendant les périodes Avant et Après.

Dans les bouses, les niveaux de présence sont importants (Sc représente plus de 10 % des levures) alors que sur les trayons, les niveaux sont très faibles (Sc ne représente jamais plus de 1 %).

### Présence de souche Actisaf SC 47 dans l'environnement ou le lait ?

L'identification de la souche par la société Phileo Lesaffre permet de préciser les résultats sur la souche distribuée.

	Prélèvement						
	Avant		Pendant		Après		
	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

La souche **Actisaf Sc 47** :

- a été identifiée au cours de la période de distribution, respectivement sur 15 et 11 des 20 échantillons de bouses et de surface des trayons
- n'a été jamais identifiée hors période de distribution pour les bouses et les trayons, ni dans l'air ou le lait quelque soit la période.

Les niveaux sont très faibles sur la surface des trayons (< à 100 UFC/ml) et beaucoup plus important dans les bouses (de l'ordre de 1 000 à 10 000 UFC/ml).

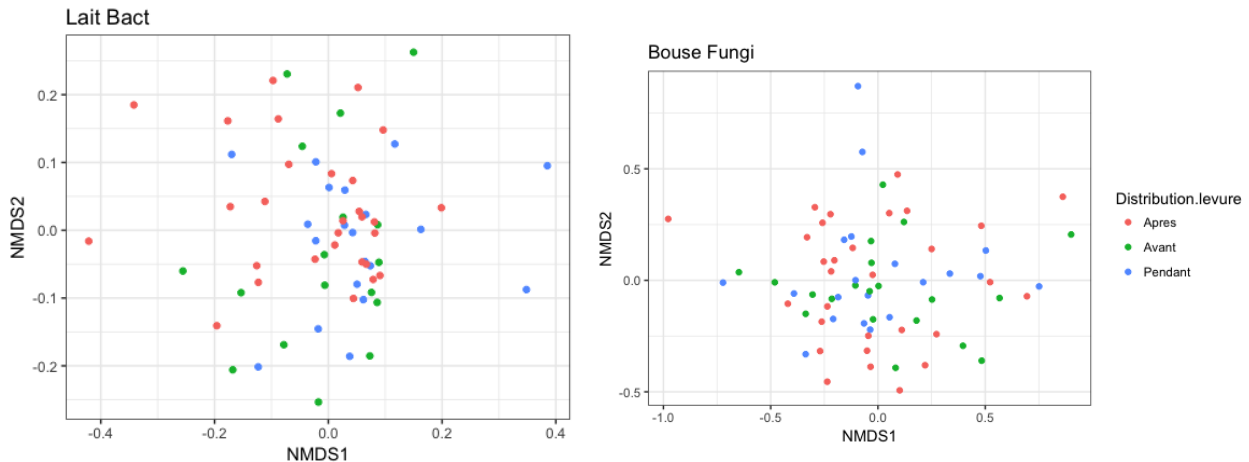
## Impact sur les équilibres microbiens ?

Grâce aux données des analyses par métabarcoding, nous avons réalisé des profils microbiens de bactéries et de levures / moisissures pour chacun des 280 échantillons.

Ces profils peuvent être projetés sur un même plan, faisant ainsi apparaître leur plus ou moins grande ressemblance.

Pour les 4 types de prélèvements (air, bouses, trayons, lait), les profils des échantillons de la période Pendant ne se distinguent pas de ceux des périodes Avant ou Après, que ce soit pour les bactéries ou les levures / moisissures. Les 2 figures illustrent cette ressemblance pour les bactéries dans le lait et les levures moisissures dans les bouses.

Grâce à des tests statistiques, nous pouvons conclure que **les équilibres microbiens ne sont pas différents en fonction des périodes** : la distribution de levure **vivante** n'a donc pas d'impact sur les équilibres microbiens de l'environnement de l'étable ou de ceux du lait.



### En synthèse :

Avec le protocole mis en œuvre et le nombre d'exploitations suivies, nous avons pu vérifier que lors de la distribution aux vaches laitières de levure vivante, la souche distribuée **était pendant la période de distribution** :

→ présente :

**dans les bouses, en quantité importante  
et en faible quantité sur les trayons**

→ non présente dans l'air ou le lait.

3 semaines après l'arrêt de la distribution, la souche n'est retrouvée dans aucun des échantillons, mettant en évidence qu'il n'y a pas de rémanence.

**La dissémination de la levure dans l'environnement est donc très limitée.** Pour autant, sa présence sur les trayons ne permet pas d'exclure tout risque de contamination du lait ou des fromages dans le cas de producteurs fermiers.

La distribution de levure **n'entraîne pas de modification détectables des équilibres microbiens**, tant de l'environnement que du lait.

Cette expérimentation n'aurait pu être mise en œuvre sans :

le soutien financier du Pep Bovin Lait et du Conseil Départemental Savoie,

la participation active de tous les partenaires techniques,

l'engagement des 10 producteurs

et le travail exemplaire réalisé par Chloé Marchandise.

Nous tenons à vivement remercier l'investissement de chacun,

ayant permis le bon déroulement de l'étude.

## Les apports du métabarcoding :

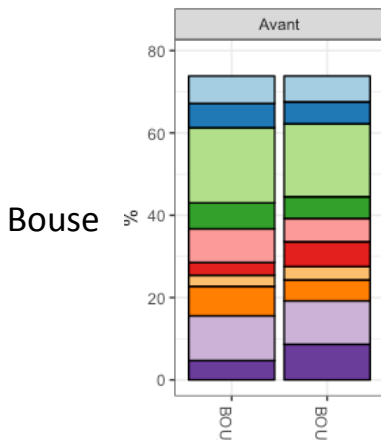
Pour décrire de façon très précise les équilibre microbiens des différents échantillons, nous avons utilisé à titre exploratoire le métabarcoding. Ce type d'analyse est vouée à se développer et il paraît ainsi intéressant d'illustrer le type de résultats fournis.

### Pour chaque échantillon :

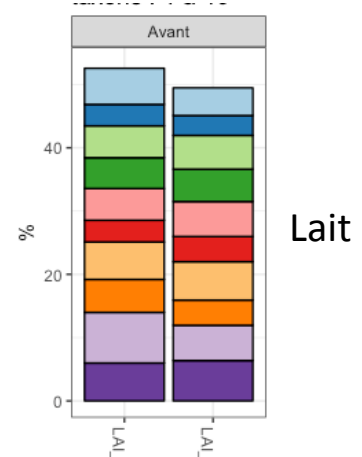
→ Le nombre total d'espèces bactériennes ou de levures/moisissures présentes. Les moyennes par type de prélèvement sont présentés dans le tableau ci contre.

→ La liste de toutes les espèces par échantillon ainsi que leur importance relative. Le nombre important d'espèces rend la visualisation très difficile. Pour illustration, les figures suivantes représentent les 10 espèces les plus importantes respectivement dans un échantillon de bouses et de laits

	Bouse	Air	Trayon	Lait
<b>Bactérie</b>	130	178	162	<b>225</b>
Lev/Mois	77	109	115	25



Par la lecture de l'échelle, il apparaît que ces 10 espèces majoritaires représentent plus de 70 % des bactéries dans les bouses mais moins de 50 % dans le lait, ce qui illustre la plus grande diversité bactérienne dans le lait.

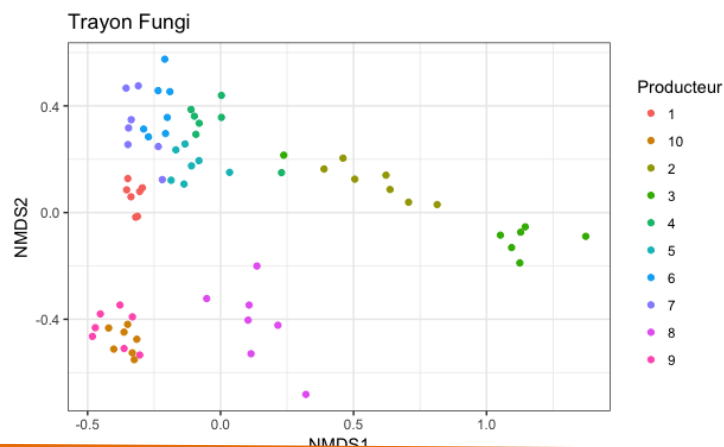
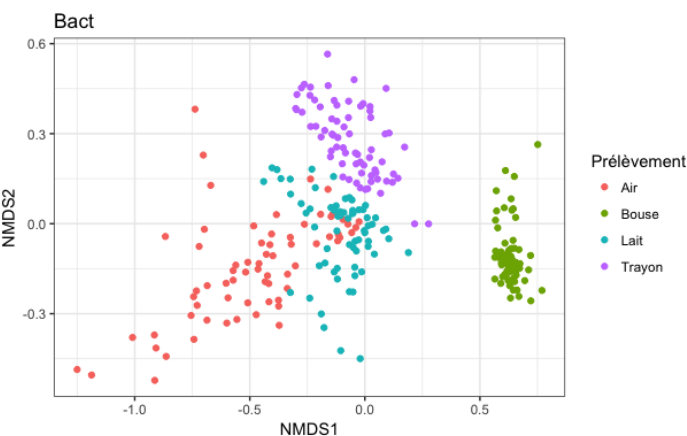


### Pour l'ensemble des échantillons :

La richesse de l'information ne permet pas de faire des comparaisons visuelles : elle doit être préalablement synthétisée en créant des profils par échantillon. Ces profils peuvent ensuite être positionnés les uns par rapport aux autres, en distinguant la nature des échantillons par des couleurs différentes. De nombreuses combinaisons sont ainsi possibles et toutes n'ont pas encore été explorées à ce jour.

Pour illustration, les figures suivantes représentent :

- les profils bactériens des échantillons selon le type de prélèvement (air, bouse, trayon, lait)
- Les profils levure/moisissure des échantillons surface des trayons selon le producteur



### Perspectives :

Ces premiers résultats sont très riches et demandent à poursuivre l'analyse. Les traitements complémentaires permettraient par exemple de décrire les différences de profil entre producteurs (quelles espèces sont présentes ou non) et surtout de rechercher les déterminants de ces profils, en particulier en termes de pratiques mises en œuvre par les producteurs