

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/236305077>

Ecosystemes des laits et des fromages au lait cru – enjeux pour leur maîtrise

Conference Paper · December 2012

CITATIONS

0

READS

133

3 authors, including:



[marie-christine christine Montel](#)

French National Institute for Agricultural R...

112 PUBLICATIONS 3,306 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Yvette Bouton](#)

French National Institute for Agricultural R...

20 PUBLICATIONS 359 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Ecosystèmes des laits et des fromages au lait cru – enjeux pour leur maîtrise

MONTEL M.C. (1), BOUTON Y. (2), PARGUEL P. (3)

(1) URF INRA 545 F-15000 Aurillac

(2) Comité Interprofessionnel du Gruyère de Comté, Unité R&D, F-39800 Poligny

(3) Institut de l'Élevage SIM F-25000 Besançon

RESUME

L'objectif est de présenter les enjeux de la maîtrise des communautés microbiennes dans les écosystèmes des laits et des fromages au lait cru (fermiers et laitiers). Leur maîtrise, entre risques et bénéfiques, vise à maintenir les spécificités organoleptiques des fromages au lait cru associées à la diversité microbienne mais aussi à garantir leur sécurité sanitaire. Dans un nouveau concept d'accompagnement des producteurs de lait, elle implique de piloter les flux microbiens des environnements de ferme au lait en s'appuyant sur la connaissance de la structure des communautés microbiennes des laits (>200 espèces), des pratiques d'élevage et de traite pouvant les moduler, de leur origine (animal-alimentation, trayons, litières...-). Tout au long de la fabrication et de l'affinage, l'enjeu est de maîtriser la dynamique et les activités des populations microbiennes à cœur et en surface de fromages régies par de multiples interactions qui restent à explorer. L'ensemencement microbien exogène et les conditions environnementales de fabrication et d'affinage en sont les principaux leviers d'action.

Milk and raw milk cheese ecosystems - stakes for their control

MONTEL M.C. (1), BOUTON Y. (2), PARGUEL P. (3)

(1) MC MONTEL URF INRA 545 F-15000 Aurillac

SUMMARY

The objective was to present the issues of control of microbial communities in milk and raw milk cheese ecosystems (farmer and dairy). Their control between risks and benefits, is aimed at maintaining the organoleptic characteristics of the raw milk cheese associated with microbial diversity but also at ensuring their safety. For a new concept to assist milk producers, this involves controlling microbial fluxes from farm environments to milk based on the knowledge of the structure of microbial communities in milks (200 species), husbandry practices and processes that can modulate their origin (animal-feeding, animal, teats, liter). The challenge throughout the manufacturing and ripening is to control the dynamics and activities of microbial populations governed by multiple interactions that remain to be explored. For that, exogenous microbial inoculation and environmental conditions of manufacturing and ripening are the main levers.

INTRODUCTION

Les fromages au lait cru sont un des fleurons de la gastronomie française et contribuent au dynamisme de l'industrie laitière française. La production annuelle de 181 000 tonnes l'est essentiellement sous signe de qualité (72% de la production d'AOP est au lait cru) (données CNIEL). Le maintien de cette production, partie intégrante de notre culture doit répondre aux exigences sanitaires de la réglementation européenne tout en satisfaisant le consommateur, à la recherche de fromages se démarquant par leur diversité et leur richesse sensorielle.

L'objectif de cette synthèse est de présenter les enjeux de la maîtrise des communautés microbiennes pour la production fromagère au lait cru (fermière et laitière).

Cette synthèse émane du groupe « écosystèmes microbiens » du RMT (Réseau Mixte Technologique) Fromages de Terroir qui se réunit depuis 2000, pour des échanges techniques et scientifiques sur les écosystèmes microbiens fromagers des productions au lait cru. Elle complète des synthèses rédigées par ce groupe à destination des professionnels, des chercheurs et techniciens (Réseau Fromages de terroirs, Microflore du lait cru, 2011).

1. NOTION D'ECOSYSTEME

Les laits et les fromages au lait cru répondent à la définition d'un écosystème (contraction de *ecological system*) puisque c'est un système fonctionnel formé par un groupement ou une communauté d'organismes, en l'occurrence de micro-organismes (*biocénose*) en constante interaction avec un environnement abiotique (*biotope*) dont les facteurs physiques, chimiques ou biologiques agissent sur la biocénose. La composition biochimique de la matière première lait, son évolution (pH, activité de l'eau (aw),

métabolites...), les conditions environnementales de fabrication et d'affinage sont des éléments du biotope.

Le fonctionnement des écosystèmes fromage dit aussi « microbiens » est la clef de voûte de la construction des différentes dimensions (sanitaire, sensorielle, santé) de la qualité des fromages au lait cru.

2. OBJECTIF DE LA MAITRISE

La maîtrise de ces écosystèmes vise donc un double objectif i) renforcer le lien au terroir en maintenant les spécificités organoleptiques des fromages au lait cru sous Appellation d'Origine Protégée et/ou transformés à la ferme et ii) garantir la sécurité sanitaire pour le consommateur. Elle implique de relever plusieurs défis relatifs au pilotage, en particulier au niveau de la production de lait. Pendant longtemps, elle a été guidée par la vision épidémiologique des risques sanitaires basés sur la seule présence de la bactérie pathogène qu'il fallait éliminer sans se soucier du maintien de la biodiversité. Cette stratégie a atteint ses objectifs puisque les fromages au lait cru présentent maintenant un haut degré de sécurité microbiologique avec des pourcentages de non conformités par rapport aux critères microbiologiques (règlement 2073-2005) faibles (EFSA, 2012) et responsables de seulement 3,4% des toxi-infections alimentaires (EFSA 2011, données 2009). Une autre logique de gestion tend à émerger ; elle vise à concilier, d'une part l'élimination des pathogènes par des pratiques d'hygiène adaptées et ciblées et, d'autre part, la préservation du patrimoine microbien pour bénéficier de ses potentialités lors de la fabrication.

3. MOYEN D'INVESTIGATION DE LA BIODIVERSITE

La gestion de la biodiversité dans l'ensemble de ces écosystèmes laitiers mais aussi environnementaux implique d'évaluer sans cesse la biodiversité microbienne. La structure d'une communauté microbienne s'apprécie par sa composition en espèces, sa diversité intraspécifique (diversité des souches au sein d'une espèce) et l'abondance relative des différentes espèces. Sa diversité en groupes fonctionnels (acidification, aromatique, aspect...) est aussi primordiale pour la qualifier. Dans un dialogue avec les professionnels fromagers, un consensus est apparu pour classer les populations en 5 groupes taxonomiques et fonctionnels : bactéries lactiques (acidification, sensoriel), bactéries dites d'affinage (sensoriel, aspect), bactéries Gram négatif (sensoriel), levures et moisissures (sensoriel).

3.1. DESCRIPTION DES COMMUNAUTES

Notre connaissance de la composition de la structure des communautés microbiennes est étroitement tributaire des méthodes mises en œuvre pour l'évaluer. L'approche Pasteurienne, par culture sur milieu et identification d'isolats par méthodes moléculaires fait encore référence pour identifier et quantifier la dynamique des différentes populations en cours de process. Sa pertinence tient du choix des milieux sur lesquels le maximum de populations microbiennes doit se développer. Ces milieux doivent être assez sélectifs pour faciliter la quantification *a minima* des grands groupes microbiens (bactéries lactiques, bactéries d'affinage, levures, Gram négatif) et pouvoir fournir une image de la communauté par le calcul de leur pourcentage respectif. La description des communautés repose aussi sur des méthodes moléculaires directes qui s'affranchissent de la culture des micro-organismes. Les populations microbiennes peuvent être quantifiées par PCR quantitative. Les méthodes chromatographiques analysant des fragments des génomes, connus sous les sigles SSCP¹, TGGE², DGGE³ ont un intérêt pour suivre des dynamiques ou pour comparer globalement la structure de communautés (Quigley *et al*, 2011). L'inventaire moléculaire par séquençage d'ADNr16S, le pyroséquençage (séquençage à haut débit) (Masoud *et al*, 2012, Quigley *et al* 2012) ou la métagénomique (séquençage de la totalité des génomes d'une communauté), les méthodes spectrales (infra rouge) (Fricker *et al*, 2011) apportent un éclairage complémentaire sur la structure, la composition et les potentialités fonctionnelles de ces communautés. Quoique très performantes, ces techniques ne sont pas encore disponibles en routine.

3.2. EVALUATION DE LEURS FONCTIONS

Pendant longtemps, les fonctions d'une communauté ont été abordées par la détermination des potentialités de chacun de ses membres sans intégrer la totalité de l'environnement microbien et physico-chimique. Ceci s'est avéré efficace pour la sélection de souches acidifiantes recherchées en début de process. La fonction acidifiante d'une communauté peut aussi être évaluée globalement par un test de lactofermentation⁴ à condition d'utiliser pour le couple temps/température les paramètres de fabrication et de valider la pertinence en regard des résultats sur les fromages. Les fonctions aromatisantes d'une communauté sont plus difficiles à aborder individu par individu et les interactions entre les individus et celles avec leur environnement doivent être prises en compte « *le tout est bien plus que la somme des*

parties » (application de l'holisme en écologie). En effet, l'arôme d'un fromage résulte d'un équilibre entre une multitude de molécules volatiles et non volatiles dont la synthèse peut impliquer plusieurs micro-organismes et est fortement dépendante de la composition de la communauté et des facteurs technologiques (Spinnler *et al*, 2003). L'appréciation globale de l'activité aromatisante d'une communauté, sa capacité à développer une couleur s'appuie sur des essais sur gélose mimant le fromage ou de façon plus pertinente sur des cocultures microbiennes plus ou moins complexes en modèles fromagers (Bonaiti *et al*, 2005).

4. GESTION EN AMONT

4.1. FLUX MICROBIENS A LA FERME

De multiples sources peuvent être à l'origine de l'ensemencement du lait, tels que l'environnement des animaux (eau, air, litière, alimentation), les animaux eux-mêmes et leurs déjections, le matériel de traite et le trayeur. Ces sources peuvent influencer les équilibres microbiens des laits comme en témoignent les liens observés entre certaines pratiques de traite ou de conduites d'animaux et les caractéristiques microbiologiques des laits crus (Bouton *et al*, 2005 ; Verdier-Metz *et al*, 2009). Des travaux récents sur les flux microbiens semblent indiquer que les communautés microbiennes des laits crus se constituent dès la ferme, dans un système ouvert, à partir d'éléments en contact direct avec le lait (réservoirs) comme les bio-aérosols, les trayons et le matériel de traite et de stockage du lait.

L'étude de Vacheyrou *et al* (2011) donne un aperçu général de la flore microbienne (fongique et bactérienne) des différents compartiments de l'étable (air, poussière, foin, peau des trayons, lait). Elle souligne l'existence d'un flux de circulation de la microflore aéroportée entre l'étable et la salle de traite, probablement induit par les mouvements des vaches, du personnel et des courants d'air dans l'étable. Outre la flore fongique, l'air et la poussière sédimentée renferment une flore bactérienne constituée essentiellement de bactéries à Gram positif dont beaucoup se retrouvent à la surface des fromages et de bacilles à Gram négatif (figure 1). La présence de ces flores dans l'environnement des étables est en partie liée à la diversité microbienne des substrats manipulés tel que l'alimentation des animaux (et en particulier le foin) ou la paille. De nombreux genres bactériens d'intérêt fromager ou indésirables, présents dans le foin, l'air et la poussière ont été identifiés dans le lait (figure 1).

D'une manière générale, la surface des trayons en contact avec le matériel de traite apparaît comme étant une des sources majeures d'ensemencement du lait en microorganismes. Avec près de soixante-dix espèces bactériennes recensées sur sa surface, le trayon offre une source intéressante de biodiversité pour le lait (Verdier-Metz *et al*, 2012). De nombreux genres bactériens ont été identifiés à la fois sur la peau des trayons et dans le lait (figure 1). Cette communauté microbienne est dominée par une grande quantité de microorganismes se développant sur la croûte des fromages au cours de l'affinage, des bactéries lactiques et des bactéries à Gram négatif (figure 1). Sa composition varie d'une ferme à l'autre et change lors de la mise à l'herbe des vaches (Verdier-Metz *et al*, 2012). Ainsi, le recensement de plusieurs espèces bactériennes habituellement rencontrées dans la phyllosphère des plantes laisse penser que la forte exposition des trayons aux végétaux pendant la période de pâturage pourrait permettre le transfert de microorganismes depuis la surface des végétaux vers le lait cru *via* le trayon. Les travaux de Fallico *et al* (2011) qui démontrent l'origine végétale d'une souche laitière de *Lactococcus lactis* renforcent ce concept de transition « plante-lait » des microorganismes. Par contre Denis et Desmazures (2004) n'ont pas établi de lien entre microorganismes de l'herbe pâturée et celle du lait. Au-delà de ces travaux d'identification des espèces microbiennes, des études d'épidémiologie moléculaire

¹ SSCP Single Strand Conformation Polymorphism

² TTGE Temporal Temperature Gel Electrophoresis

³ DGGE Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

⁴ Test consistant à observer l'évolution naturelle de l'aspect d'un lait maintenu dans un couple temps/température prédéterminé. Le résultat peut être "liquide", "floconneux", "gélifié" ou "digéré". Ce test est souvent associé à la mesure de l'évolution de l'acidité (en degré Dornick) ou du pH.

basées sur le typage de souches ont été réalisées. Ces études ont souvent porté sur des microorganismes indésirables pour les produits laitiers voire pathogènes pour l'animal ou l'homme. Toutefois, plusieurs d'entre elles se sont intéressées aux flores lactiques (*Enterococcus*, *Lactobacillus*) et ont mis en évidence à la fois dans le lait et dans l'environnement des animaux (foin, poussière, litière, trayon, bouse...) des souches présentant des profils génomiques similaires (Bouton *et al*, 2007). D'autres études basées sur le typage génétique de souches sont nécessaires pour démontrer l'existence de flux microbiens dans l'environnement des étables.

Les populations microbiennes de l'ambiance des étables et de la peau des trayons ne sont toutefois pas les seules sources de micro-organismes du lait. En effet, malgré une charge bactérienne importante dans les étables, seul un tiers de la diversité bactérienne a été identifié dans le lait (Vacheyrou *et al*, 2011). Les manchons trayeurs, par la présence de biofilms à sa surface, constitue un autre réservoir de microorganismes. En exploitations caprines, ces biofilms sont majoritairement composés de microcoques, de bactéries corynéformes et de bactéries lactiques, avec parfois dans les manchons trayeurs les plus chargés en flore totale, la présence de bactéries d'altération voire potentiellement pathogènes (Laitier *et al*, 2004). En se détachant, les biofilms peuvent ensemercer le lait comme en témoigne la ressemblance des profils génomiques de souches de *L. paracasei*, isolées des manchons trayeurs et du lait de tank (Bouton *et al*, 2007).

Si ces travaux apportent des éléments d'information non négligeables dans la connaissance des flux de circulation des microorganismes au sein des étables, ils restent encore fragmentaires pour pouvoir hiérarchiser l'importance des réservoirs dans la formation des communautés microbiennes des laits crus. En particulier, peu de données sont disponibles sur l'évolution temporelle des espèces présentes dans les réservoirs et sur l'enchaînement des pratiques influençant les flux microbiens. Une connaissance approfondie de l'apport des réservoirs dans l'ensemencement du lait nécessite un suivi temporel sur une longue période

pour intégrer le décalage entre la constitution des réservoirs et la composition microbienne des laits. En effet, la composante microbienne des ambiances ou des biofilms sur différents équipements de traite notamment peut résulter de pratiques de conduite du troupeau, de traite ou de nettoyage bien antérieures à celles observées à l'instant t de l'analyse du lait.

4.2. GESTION DE LA COMMUNAUTE MICROBIENNE DES LAITS

4.2.1. Facteurs de variation

Un grand nombre de populations microbiennes (espèces), peuple les laits destinés à la transformation en fromages au lait cru car aucun traitement du lait ne réduit la biodiversité. Ainsi plus de 200 espèces microbiennes ont été décrites dans les laits. Les bactéries d'affinage (*Corynebacterium*, *Microbacterium* et *Staphylococcus* non pathogène) y sont qualitativement (49 espèces) et quantitativement importantes (de l'ordre de 10^3 ufc/ml de lait de vache), suivi des bactéries lactiques, (15 espèces) et des bactéries à Gram négatif (51 espèces). Les levures (37 espèces) et les moisissures (40 espèces) avec des niveaux le plus souvent inférieurs à 10^2 ufc/ml sont quantitativement sous dominantes (Fricker *et al*, 2011 ; Lavoie *et al*, 2012, Mallet *et al*, 2012). Les proportions des niveaux des différents groupes, la diversité des espèces sont éminemment variables d'un lait à l'autre, en lien avec la diversité des environnements de ferme (cf ; 5.1, flux microbiens à la ferme). Par exemple, la proportion de niveaux de bactéries lactiques dans un lait de vache peut varier entre 1% et 68% (Mallet *et al*, 2012). La taille du troupeau, la race et l'alimentation des animaux, le logement (litière paillée ou non) mais surtout les pratiques de traite (lavage des trayons avant la traite, post trempage, nettoyage de la machine à traire) sont des éléments qui, plus ou moins combinés, déterminent la composition et la structure des communautés microbiennes du lait (cf. tableau 1). La plupart de ces facteurs en amont de la machine à traire influent de façon similaire sur la communauté microbienne des trayons (Monsallier *et al*, 2012)

Tableau 1 : Exemple de quelques pratiques d'élevage ou de traite influençant les niveaux de populations des principaux groupes microbiens du lait

Pratiques	Effet sur la communauté microbienne des laits
Espace d'air/ animal	En ovin : augmentation de l'espace air/animal de 4,1 à 7,3m ³ /animal, diminution du niveau de bactéries aérobies mésophiles (Sevi <i>et al</i> , 2001).
Taille du troupeau, volume de lait	En bovin : augmentation des bactéries à Gram négatif et moisissures dans des troupeaux <30 vaches et de volume de tank <2000L (Mallet <i>et al</i> , 2012).
Période de l'année	En bovin : variation des niveaux de populations des laits entre l'hiver et l'été (Mallet <i>et al</i> , 2012) ; augmentation des <i>Staphylococcus</i> et <i>Lactobacillus</i> au paturage (Hagi <i>et al</i> , 2010). En caprin : variation du profil microbien sur une période de lactation (Callon <i>et al</i> , 2007).
Température de lavage de la machine à traire	en caprin : faible niveau de germes pour la température de lavage >55°C associée à une litière sur paille. Dominance des entérocoques quand T°<40°C (Tormo <i>et al</i> , 2011). en bovin : développement des bactéries Gram négatif si la température de lavage <42°C (Feldamnn <i>et al</i> , 2006).
Lactoducs Nettoyage machine à traire	En bovin : prédominance de la flore d'intérêt si lactoduc >15 m (Michel <i>et al</i> , 2001) Faible niveau de flores si nettoyage intensif de la machine à traire. Développement des bactéries Gram négatifs si alternance journalière de produits acides et basiques (Michel <i>et al</i> , 2001).
Lavage des trayons	En bovin : richesse en flores d'intérêt technologique si pratiques peu intensives (pas de lavage des trayons, pas de post trempage) (Michel <i>et al</i> , 2001 ; Verdier-metz <i>et al</i> , 2009 ; Mallet <i>et al</i> , 2012).

Après la traite, le lait est très souvent réfrigéré à des températures de 4°C pour contrôler l'évolution des microflore et en particulier celle des bactéries pathogènes. Mais une telle réfrigération modifie les proportions des différents groupes microbiens et ceci de manière plus ou moins importante selon la durée du report. Au détriment d'autres populations, elle sélectionne en effet des bactéries Gram négative psychrotolérantes qui, par protéolyse et lipolyse, modifieront aussi les caractéristiques biochimiques des laits (Lafarge *et al.*, 2004, Fricker *et al.*, 2011). Un report de lait à 12°C, malgré son effet amplificateur, devrait permettre de mieux respecter les équilibres initiaux des laits (Pelissier *et al.*, 2009). Son effet sur la qualité sanitaire (risque par rapport au développement de *S. aureus*) et sensorielle des fromages reste à préciser. Le transport du lait, le stockage en laiterie modifie également la composition microbienne des laits crus puisque des laits de tank à la laiterie sont dominés par les bactéries à Gram négatif tandis que les bactéries à Gram positif (bactéries d'affinage) dominant dans ceux de tank à la ferme (Fricker *et al.*, 2011).

4.2.2. Stratégies d'accompagnement

L'ensemble de ces données bibliographiques sur la variation de composition des laits apporte des éléments scientifiques pour rationaliser l'organisation de la collecte par les laiteries qui s'appuie actuellement sur quelques critères microbiologiques (traitement statistique des résultats du paiement du lait à la qualité) et, éventuellement, intègre les zones géographiques de collecte. Ce tri est guidé soit par la volonté d'expression de la richesse microbienne des laits de certaines zones, soit, au contraire, par un souhait de standardisation des fabrications par la réalisation de grands mélanges.

Cependant, la préoccupation sanitaire est une priorité pour les filières fromagères au lait cru, surtout pour les technologies fromagères favorisant la croissance des pathogènes. Ainsi, les critères microbiologiques de tri des laits et d'accompagnement technique se basent prioritairement sur les niveaux de *Staphylococcus* à coagulase +, *Listeria*, *Salmonella* et coliformes. La conviction que cette attitude peut amener à un appauvrissement en populations microbiennes des laits, au point d'une perte de typicité des fromages, est de plus en plus souvent exprimée par les fromagers. Pour limiter cet appauvrissement systématique des flores tout en garantissant la sécurité sanitaire, deux stratégies se sont développées : la première vise à raisonner les pratiques d'élevage au cas par cas, suite à une analyse des risques dans chaque exploitation laitière et la deuxième consiste, tout en intégrant la préoccupation sanitaire, à préconiser des pratiques moins agressives vis à vis des populations microbiennes naturelles, en particulier au niveau du nettoyage des trayons, du lavage de la machine à traire ou encore de la température de report du lait à la ferme. La première stratégie a été initiée, dès le début des années 1990, par un groupe d'industriels de l'agro-alimentaire (groupe AQ 2000) persuadés que l'application de l'Assurance Qualité (norme ISO 9000) ne pouvait se concevoir que complétée par une maîtrise des risques sanitaires (HACCP) à toutes les étapes de la production ; cette attitude a été reprise par le Codex Alimentarius (qui a édité une norme guide pour le HACCP) et les arguments ont été repris lors des débats sur le lait cru et transcrits dans les réglementations européennes. Si la réglementation européenne n'a pas rendu obligatoire l'application des principes du HACCP en production laitière, certaines laiteries (ou filières) ont décliné cette stratégie en instituant des formations des éleveurs à la connaissance des pathogènes, des analyses des processus en regard des risques de contamination et des plans de surveillance organisant la réaction de l'éleveur en cas d'incident. La lourdeur de la mise en œuvre de cette stratégie a amené les organismes techniques à s'orienter davantage vers des préconisations raisonnables issues des guides de bonnes pratiques d'hygiène (GBPH).

La deuxième stratégie vise à promouvoir des techniques davantage respectueuses des populations microbiennes naturelles des laits. Ainsi l'utilisation systématique de lessives contenant des désinfectants, le plus souvent du chlore, est remise en cause en raison de la présence fréquente de résidus après rinçage, résidus suspectés nuire aux flores microbiennes secondaires du lait (Michel *et al.*, 2005). L'utilisation de la laine de bois semble être une technique plus respectueuse de la flore du trayon comparativement au pré-trempe et ce, particulièrement en période de pâturage lorsque la charge microbienne sur les trayons est globalement plus faible (Bouton *et al.*, 2012). Les préconisations portent de plus en plus sur la qualité du logement, celle de l'alimentation des animaux et sur la performance des systèmes de lavage des machines (turbulence au moment du nettoyage).

Afin de mettre en place un accompagnement personnalisé pour la maîtrise de la qualité microbiologique des laits, un programme de recherche a été initié en 2011 (programme FLORACQ). Pour différentes espèces animales et dans 4 régions de montagne, la démarche est basée sur un diagnostic initial des pratiques et de la qualité des laits appréciée par la mesure de la proportion des principaux groupes microbiens et des tests de lactofermentation (outil déjà utilisé en filière Comté), qui va déterminer un changement ou non de pratiques dont les effets seront mesurés. Le programme évaluera comment producteurs et transformateurs fromagers s'approprient les outils de mesure de la qualité microbiologique des laits destinées à la transformation fromagère tel que le calcul de la proportion des niveaux de ces groupes microbiens (indice relatif - IR). Cet indice proposé aux producteurs de lait et aux transformateurs est a priori rapide et facile à mettre en œuvre en routine. En l'associant à la qualité des fromages peut-il être pertinent pour évaluer la qualité fromagère du lait ? Une analyse sociologique des réactions des éleveurs et des techniciens permettra d'évaluer leur perception du rôle des micro-organismes. Elle met aussi l'accent sur la nécessaire formation de l'ensemble des acteurs (producteurs de lait, transformateurs, techniciens) à la microbiologie pour dépasser la simple vulgarisation et s'inscrire dans une stratégie de pédagogie.

5. MAITRISE DES PROCÉDES FROMAGERS

5.1. BÉNÉFICES DU FONCTIONNEMENT DE L'ÉCOSYSTÈME FROMAGE

L'écosystème fromage ne fonctionnerait pas sans la vie microbienne.

Son fonctionnement doit garantir la qualité sanitaire en éliminant les bactéries pathogènes (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines) ou en évitant la production de métabolites indésirables (toxines, amines). Les populations microbiennes dans leurs interactions les unes avec les autres peuvent inhiber les espèces pathogènes par abaissement du pH, production de métabolites inhibiteurs (acides organiques, H₂O₂), peptides (bactériocines), éthanol et/ou par compétitions nutritionnelles. Elles génèrent de multiples barrières biologiques à côté de barrières environnementales, base du concept de la technologie de barrière « d'hurdle technology ». Le contrôle de *L. monocytogenes* dans les fromages en est une illustration. Ainsi, *L. innocua* ou *L. monocytogenes* peuvent être inhibés par des consortia microbiens naturellement présents à la surface de fromages à croûte lavée (Roth *et al.*, 2010, Maoz *et al.*, 2003) ou à cœur des fromages à pâte pressée non cuite (Millet *et al.*, 2006). La diversité de la dynamique des populations microbiennes génère de la richesse et la diversité sensorielle des fromages, garant de leur typicité. Ainsi, pour un fromage d'une même technologie, les fromages au lait cru ont une plus forte intensité aromatique que ceux au lait pasteurisé (Chambers *et al.*, 2010 ; Beuvier et Buchin, 2004) ou que

ceux au lait microfiltré (Bouton et Grapin, 1995). De plus, dans un même process technologique, pour une même matière première lait épuré en micro-organismes (microfiltration, pasteurisation), l'addition dans les laits de communautés microbiennes naturelles de composition différente engendre de la diversité sensorielle comme cela a pu être montré en fromages AOP Comté (Demarigny *et al*, 1997) ou en AOP Salers (Callon *et al*, 2005). Il est certain que la vie microbienne contribue à la dégradation des protéines, des acides aminés et est responsable de la production d'une diversité de molécules aromatiques en proportions subtiles et variables d'un fromage à l'autre. Cependant, dans les communautés complexes, la contribution des différentes populations microbiennes en terme qualitatif et quantitatif à cette synthèse est loin d'être élucidée (Spinnler *et al*, 2003, Duthoit *et al*, 2005). Mais dans des modèles fromagers, certaines espèces à Gram négatif comme *Proteus vulgaris* ou *Hafnia alvei* ont un fort impact sensoriel par production de composés soufrés, d'aldéhydes, d'esters... (Deetae *et al*, 2007 ; Irlinger *et al*, 2012)

Les fromages au lait cru pourraient contribuer à la santé humaine. L'hypothèse « hygiéniste » est souvent évoquée et suggère que l'exposition aux micro-organismes et à leurs métabolites dans la prime enfance (à travers l'environnement de la ferme) favoriserait les réponses immunitaires innées qui supprimeraient l'atopie ; ces stimuli pourraient être déficients en cas de maladies allergiques (Racila et Kline, 2005). De plus, le contact avec les animaux, la consommation de lait de ferme et/ou de produits laitiers fermiers assure, tout ou moins partiellement, une protection contre certains phénomènes d'allergie (Waser *et al*, 2007). La consommation de fromages au lait cru pourrait aussi limiter la colonisation des voies intestinales par certains germes antibiorésistants (Bertrand *et al*, 2007).

5.1. QUELS MOYENS DE MAITRISE ?

La maîtrise des fermentations microbiennes dans les fabrications fromagères aux communautés microbiennes de composition complexe oscille entre empirisme et raisonnement. La fermentation spontanée, activité majeure de cet écosystème, est un procédé millénaire de conservation du lait. Mais, depuis Pasteur, le rôle des micro-organismes, agents des fermentations dans l'élaboration des qualités de produits fermentés est acquis bien que le fonctionnement de ces écosystèmes fromage aux populations microbiennes diverses et variables reste encore partiellement une boîte noire. La formule de Pasteur: "C'est Claude Bernard qui a raison, le terrain est tout, le microbe n'est rien" témoigne que la vie des micro-organismes ne peut être comprise sans tenir compte de leur environnement. En effet la composition biochimique du lait, la vitesse d'acidification, l'addition de souches microbiennes exogènes, le pressage, le salage en surface ou dans la masse, le chauffage ou non du caillé, les températures de fabrication et d'affinage, la taille des fromages, leur temps d'affinage sont autant de facteurs qui, combinés, conditionnent la dynamique des populations microbiennes natives des laits crus et modulent leurs interactions et l'expression de leurs potentialités enzymatiques intrinsèques. La multiplicité de ces interactions rend ainsi difficile la hiérarchisation des facteurs impliqués et par conséquent le pilotage des fermentations complexes

Face à cette complexité, et au fil de leur expérience, les fromagers se sont créés des référentiels associant critères microbiologiques, physicochimiques et suivi de la qualité des fromages.

5.1.1. Maîtrise par des apports exogènes de levains naturels ou de ferments sélectionnés

L'enrichissement du lait en micro-organismes par ajout de lactosérum, de lait mûré, de cultures microbiennes sur lait ou lactosérum, ajout de ferments lactiques thermophiles ou mésophiles sélectionnés ou « sauvages » ou de ferments

d'affinage (bactéries, levures, moisissures) est un des leviers d'action dont dispose le fromager pour pallier des défauts de composition microbienne des laits ou limiter l'expression des populations microbiennes des laits mis en cuve. Celles-ci proviennent des laits crus et des environnements de fabrication (populations microbiennes aéroportées ou biofilms microbiens des équipements).

Systématiquement, pour assurer l'acidification et l'égouttage, et sur le constat de laits arrivant en fromagerie avec de faibles quantités de flores acidifiantes, le fromager procède à un ensemencement lactique qui permettra d'obtenir des populations microbiennes des laits mis en fabrication pouvant atteindre 10^6 UFC/ml. La nature et le niveau du ferment seront ajustés en fonction de la composition de la matière première et en jouant également sur la température pour obtenir la vitesse d'acidification souhaitée aux premières étapes de la fabrication. Le risque sanitaire guide souvent ce levier technologique mais il peut aussi être piloté par une volonté de laisser s'exprimer les populations microbiennes du lait (celles des laits crus et des ambiances de fromagerie). Ces bactéries lactiques apportées créent un déséquilibre avec les populations microbiennes natives des laits crus qui s'accroissent pendant la phase fabrication. Ainsi, au moment du démoulage des fromages, les bactéries lactiques acidifiantes atteignent des niveaux proches de 10^8 à 10^9 UFC/g de caillé alors que la microflore naturelle du lait présente des niveaux souvent inférieurs à 10^4 UFC/g de caillé.

5.1.2. Maîtrise des process de fabrication et d'affinage

En cours de fabrication et d'affinage, les populations microbiennes des laits, autres que les ferments ensemencés, vont se développer. Dans la pâte, leur dynamique est étroitement tributaire de cette phase d'acidification, par abaissement de pH et par la compétition qu'elle entraîne entre ferments exogènes et populations microbiennes natives du lait. Mais elle est aussi associée à d'autres paramètres de fabrication et d'affinage favorisant le développement de certaines populations et en éliminant d'autres.

A titre d'exemple, le chauffage du caillé dans les technologies pâtes pressées cuites, telle que celle du comté, sélectionne des bactéries lactiques thermophiles puis mésophiles et des bactéries propioniques. Les bactéries corynéformes, les levures ne se développent pas et les autres bactéries lactiques tels que leuconostocs, *Lactococcus*, certaines espèces de *Lactobacillus* disparaissent dès le début de la fabrication (Berthier *et al*, 2003).

Par contre, en technologie pâtes pressées non cuites, sans addition massive de ferments (cas de l'AOP salers), les flores thermophiles sont sous dominantes alors que les autres flores lactiques (*Leuconostocs*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*), les flores Gram négatif et une grande diversité de levures vont se développer (Callon *et al*, 2004, Callon *et al*, 2006).

En cours d'affinage l'implantation à cœur des fromages des populations endogènes du lait (*versus* ferments ajoutés) est souvent variable et imprédictible. Ainsi, la dynamique des souches des populations des bactéries lactiques dans des fromages Comté (Depouilly *et al*, 2003) ou des *Lactobacilli* au cœur de fromages camembert au lait cru (Henri-Dubernet *et al*, 2008) est spécifique à chaque fromagerie.

Sur la croûte des fromages, les bactéries d'affinage (bactéries corynéformes, *Staphylococcus*), levures et moisissures deviennent dominantes (Maoz *et al*, 2003, Monnet *et al*, 2005; Mounier *et al*, 2009, Quigley *et al*, 2012). Les interactions levures- bactéries jouent un rôle important dans l'implantation de ces micro-organismes en surface de fromages (Mounier *et al*, 2007). Sur la croûte de fromages la présence de bactéries d'origine marine (*Marinilactibacillus psychrotolerans*, *Alkalibacterium olivapovliticus*) (Ishikawa *et al*, 2007) et le fort pouvoir colonisateur de bactéries à Gram négatif (Irlinger *et al*, 2012 ; Quigley *et al*, 2012) interroge. De la même façon que pour les flux microbiens des environnements de ferme vers le lait, ceux durant l'affinage

ne sont pas encore élucidés. Comment les populations des laits crus y contribuent ? Est-ce par colonisation de la surface des fromages ? (Des pratiques empiriques d'affinage visent à faire cohabiter dans les caves des fromages jeunes et vieux). Les saumures utilisées pour le salage ou les soins peuvent-elles être aussi source de micro-organismes ? Quelles autres sources contribuent-elles à créer ce microbiote d'affinage ? Quels rôles des flores fongiques et d'affinage, apportées comme ferments ? Mounier *et al* (2007) ont montré que les micro-organismes adventives des environnements (saumure, planche d'affinage...) se développaient en surface des fromages à croûte lavée et numériquement surpassent rapidement les cultures microbiennes commerciales. De même un ferment d'affinage (*Arthobacter*) pulvérisé à la surface des fromages à croûte lavée au lait cru s'implanterait mal (Feurer *et al*, 2004). Par contre, *Geotrichum candidum* (ferment exogène) colonise facilement la surface de nombreux fromages affinés, en particulier ceux à pâte molle, jouant un rôle essentiel sur leurs caractéristiques sensorielles et pouvant parfois engendrer des défauts lors du développement excessif de certaines souches (Boutrou et Gueguen, 2004).

La qualité microbiologique et biochimique des fromages peut être pilotée en jouant sur les atmosphères dans les caves d'affinage. Ainsi Picque *et al.* (2009) et Leclercq-Perlat *et al.* (2006) ont montré que l'activité respiratoire et la protéolyse des fromages à pâte molle pouvaient être augmentées en augmentant la concentration en CO₂ (entre 2 et 6%), sans toutefois dépasser 6% pour ne pas altérer l'aspect des fromages. La ventilation des caves d'affinage est aussi un facteur important. L'hétérogénéité de la circulation d'air oblige souvent les fromagers à déplacer et réorganiser les piles de fromages dans les caves afin d'assurer la même perte d'eau et une apparence uniforme de la surface du fromage. L'application de ventilation séquentielle économise de l'énergie sans affecter les qualités microbiennes et sensorielles des fromages type pâte pressée non cuite (Picque *et al*, 2009).

CONCLUSION

L'approche microbiologique dans le processus fromager s'est longtemps focalisée sur la maîtrise des défauts et des risques sanitaires. La stratégie de gestion des communautés microbiennes par analyse « risques - bénéfiques » n'en est encore qu'à ses balbutiements. Par ailleurs, au niveau des filières, le débat autour du défi consistant à concilier bénéfiques et risques dans la gestion des communautés microbiennes est encore d'actualité. Il peut s'appuyer sur le concept de « l'analyse quantitative des risques » mais aussi sur les connaissances acquises sur les réservoirs de flores et sur les leviers d'action au niveau de la production de lait et des pratiques de traite. Pour la gestion et la protection des processus aboutissant à des produits originaux (différents des standard) et originel (différences attribuées au lieu de production), elle peut aussi mobiliser les nouveaux outils moléculaires (métagénomique). Dans cette approche de la biodiversité, respectant les valeurs gastronomique, santé et patrimoniale non délocalisables qui y sont associées, la responsabilité du chercheur est engagée. Le chercheur doit fournir des connaissances « pour comprendre et pour agir », en concertation avec les partenaires de terrain. Le champ de recherche ainsi ouvert est large et complexe. Ainsi, la communauté scientifique peut être interpellée pour comprendre les flux microbiens et les points de rupture du lait de la sortie de la mamelle jusqu'au lait en cuve de fromagerie. La recherche est aussi associée au maintien de particularités qui seraient remises en cause par des comportements sécurisant sur les plans technologiques et sanitaires. Mais le chercheur, et plus largement la communauté scientifique, doit s'interroger sur les finalités de ses recherches pour ne pas mettre en péril un patrimoine

public garant des particularités locales sur lequel s'appuient des activités humaines perdurant dans des zones souvent difficiles. Les connaissances nécessaires pour reconstituer artificiellement un fromage au lait cru ne seront pas disponibles dans un proche avenir. Le maintien d'un réseau de responsables de recherche en lien avec l'enseignement et la profession (RMT fromages de terroir – groupe écosystèmes microbiens) et les liens de ce réseau avec des équipes d'autres pays et d'autres cultures restent un garant scientifique et professionnel d'une recherche au service du développement local.

Les auteurs remercient chaleureusement les partenaires du RMT et les participants au groupe écosystème pour leur contribution à cette synthèse au travers de leur implication dans la rédaction de l'ouvrage « microflore des laits crus »

Bertrand, X., Dufour, V., Millon, L., Beuvier, E., Gbaguidi-Haore, H., Piarroux, R., Vuitton D.A., Talon D. 2007. J. Appl. Microbiol. 102, 1052-1059.

Berthier, F., Beuvier, E., Bouton, Y., Depouilly, A., Dufrene, F., Guyot P. 2003. In INRA (Editor) « les fermentations au service des produits du terroir », France 205-215.

Beuvier, E., Buchin, S. 2004. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, T. P. Guinee (editors), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 1, 319-45.

Bonati, C., Irlinger, F., Spinnler, H. E., Engel, E. 2005. J. Dairy Sci. 88, 1671-1684.

Bouton, Y., Grappin, R. 1995. Lait 75, 31-44.

Bouton, Y., Tessier, L., Guyot, P., Beuvier, E. 2005. Renc. Rech. Ruminants 12, 403.

Bouton, Y., Guyot, P., Vacheyrou, M., Normand, AC, Piarroux, R., Beuvier, E. 2007. 15^e CBL, Rennes 13-15 nov. France.

Bouton, Y., Guyot, P., Chapuis, D., Ducret, J.M., Bérodiér, A., Courtot, L. 2012. Renc. Rech. Ruminants 19.

Boutrou, R., Gueguen, M. 2005. Int. J. Food Microbiol. 102, 1-20

Callon, C., Millet, L., Montel, M.C. 2004. J. Dairy Research, 71, 231-244.

Callon, C., Berdague, J.L., Dufour, E, Montel, M.C. 2005. J. Dairy Sci. 88, 3840-3850.

Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F., Montel, M.C. 2006. System Appl. Microbiol. 29, 172-80.

Callon, C., Duthoit, F., Delbès, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Crémoux, R., Montel, M.C. 2007 Syst. Appl. Microbiol. 30, 547-60.

Chambers, D. H., Esteve, E., Retiveau, A. 2010. J. Sensory Studies 25, 494-511.

Deetae, P., Bonnarne P., Spinnler H., Helinck S. 2007. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 1161-71.

Demarigny, Y., Beuvier, E., Buchin, S., Pochet, S., Grappin R. 1997. Lait 77, 151-167.

Denis, C., Desmazures, N. 2004. Rapport d'étude ADRIA Normandie.

Depouilly, A., Dufrene, F., Beuvier, E., Berthier, F. 2003. Lait 84, 155-168.

Duthoit, F., Callon, C., Tessier, L., Montel, M.C., 2005. Int. J. Food Microbiol. 103, 259-270.

EFSA 2011 EFSA Journal 9, 2090

EFSA 2012-EFSA Journal 10, 2726.

Fallico, V., McAuliffe O., Fitzgerald G.F., Ross R.P. 2011. Appl. Environ. Microbiol. 77, 6451-6452.

Feldmann, M., Zimmermann, A., Hoedemaker, M. 2006. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 113, 274-81.

Feurer, C., Vallaëys, T., Corrieu, G., Irlinger, F. 2004. J. Dairy Sci. 87, 3189-3197.

Floracq programme CASDAR sur « Accompagner les producteurs de lait engagés dans des filières sous signe de qualité et d'origine pour gérer la flore microbienne des laits crus ».

- Fricker, M., Skånseng, B., Rudi, K. Stessl, B., Ehling-Schulz, M. 2011.** *Int. J. Food Microbiol.* 145, S24–S30.
- Hagi, T., Kobayashi, M., Nomura, M. 2010.** *Bioscience, Biotechnol. Biochem.* 74(3) 484-487.
- Henry-Dubernet, S., Desmasures, N., Gueguen, M. 2008** *Can. J. Microbiol.* 54, 218-228.
- Irlinger, F., Ah Yuen In Yung, S., Sarthou, A.S, Delbès-Paus, C., Montel, M.C., Coton, E., Coton, M., Helinck, S. 2012.** *Int. J. Food Microbiol.* 153, 332-338.
- Ishikawa, M., Kodama, K., Yasuda, H., Okamoto-Kainuma, A., Koizumi K., Yamasato, K. 2007.** *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 308–313.
- Lafarge, V., Ogier, J.-C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.-Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A., 2004.** *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5644–5650.
- Laithier C, Chatelin YM, Tormo H, Lefrileux Y. 2004.** *Renc. Rech. ruminants* 10, 112.
- Lavoie K., Touchette M., St-Gelais D., Labrie S. 2012.** *Dairy Sci. Technol.* DOI: 10.1007/s13594-011-0051-4.
- Leclercq-Perlat, M.N., Picque, D., Riahi, H., Corrieu, G., 2006.** *J. Dairy Sci.* 89, 3260-3273.
- Leclercq-Perlat, M.N., Irlinger F. 2010.** *Food Microbiol.* 27, 302-310.
- Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A., Desmasures N. 2012.** *Int. Dairy J.* DOI:10.1016/j.idairyj.2012.07.009.
- Maoz, A., Mayr, R., Scherer S. 2003.** *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4012-18.
- Masoud, W., Vogensen, F.K., Lillevang, S., Abu Al-Soud, W., Sørensen, S.J., Jakobsen, M. 2012.** *Int. J. Food Microbiol.* 153, 192–202
- Michel, V., Hauwuy, A., Chamba, J.F. 2001.** *Lait* 81, 575-92.
- Michel, V., A. Hauwuy, M.C. Montel, J.B. Coulon, J.F. Chamba, 2005.** *Territoires et enjeux du développement régional.* Lyon, 9-11 Mars 2005. INRA.
- Millet, L., Saubusse, M., Didienne, R., Tessier, L., Montel, M. C. 2006.** *Int J Food Microbiol* 108, 105-14.
- Monnet, C., Bleicher, A., Neuhaus, K., Sarthou, A-S., 2010** *Food Microbiology* 27, 302-310
- Mounier, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G.F., T. M. Cogan. 2005** *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6489-500.
- Mounier, J., Rea, M. C., O'Connor, P.M., Fitzgerald, G. F., Cogan, T.M. 2007** *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7732-39.
- Mounier, J., Monnet C., Jacques, N., Antoinette, A., Irlinger, F. 2009.** *Int. J. Food Microbiol.* 133, 31-37
- Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Agabriel, C., Martin, B., Montel M.C. 2012.** *Dairy Sci. Technol.* 92, 265-278.
- Picque, D., Leclercq-Perlat, M.N., Corrieu, G. 2006.** *J. Dairy Sci.* 89, 3250–3259.
- Picque, D., Guillemin, H., Mirade, P.S., Didienne, R., Lavigne, R., Perret, B., Montel, M.C., Corrieu, G. 2009.** *Int. Dairy Journal* 9, 489-497.
- Pelissier, F., Piednoir, R.L., Didienne, R., Montel, M.C. 2009.** *4th Dairy Science and Technology week - Rennes – 20-24 Avril* (Poster).
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. 2011.** *Int. J. Food Microbiol.* 150, 81-94.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Tom, P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P. D. 2012** *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5717-23.
- Racila, D.M, Kline, J.N. 2005.** *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 1202-1205.
- Réseau Fromages de Terroirs 2011** CNAOL (Editor) « Microflore du lait cru – vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation ». 129p.
- Roth, E., Miescher Schwenninger, S., Hasler, M., Eugster-Meier, E., Lacroix, C. 2010.** *BMC Microbiol.* 10, no. 1.
- Sevi, A., Taibi, L., Albenzio, M, Annicchiarico, G., Muscio, A. 2010.** *J. Dairy Sci.* 84, 2632-2640.
- Spinnler, E.H., Bonnarme, P., Irlinger, F., Leclercq-Perlat M.N. 2003.** In INRA (Editor) « Les fermentations au service des produits du terroir », France 237-243
- Tormo, H., Agabriel, C., Lopez, C., Lekhal, D. A.H., Roques, C. 2011.** *Int. J. Dairy Sci.* 6, 13-28.
- Vacheyrou, M., Normand, A.C, Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., Bouton, Y. 2011.** *Int J Food Microbiol* 146, 253–262.
- Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbes, C., Montel, M.C., 2009.** *Food Microbiol.* 26, 305-310.
- Verdier-Metz, I., Gagne G., Bornes S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbes-Paus, C., Montel, M.C. 2012.** *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 326-333.
- Waser, M., Michels, K.B., Bieli, C., Floistrup, H., Pershagen, G., von Mutius, E., Ege, M., Riedler, J., Schram-Bijkerk, D., Brunekreef, B., van Hage, M., Lauener, R., Braun-Fahrlander, C. 2007.** *Clin. Experiment. Allergy.* 37, 661-670.

Figure 1 : Transferts potentiels des principaux genres microbiens (bacilles et coques à Gram positif, bacilles à Gram négatif identifiés dans le lait (d'après Vacheyrou *et al.* 2011 ; Verdier-Metz *et al.* 2012, Masoud *et al.*, 2012, Quigley *et al.*, 2012).

« Autre » signifie que les genres *Dermacoccus*, *Lactococcus* et *Deinococcus* proviennent d'une source différente de celles étudiées ici ou bien que leur charge microbienne était inférieure au seuil de détection. Remarque : Les souches présentes dans le lait et l'environnement de l'étable, bien qu'appartenant aux mêmes genres ne sont pas forcément les mêmes.

