

Université Abdelhamid Ibn Badis-  
Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2020

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**Mlle. SADDOK Salima**

Pour l'obtention du diplôme de

**Master en Biologie**

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

**Thème**

**Détermination du profil de sensibilité aux antibiotiques des  
*Streptococcus thermophilus* isolés à partir des produits laitiers  
algériens.**

Déposé le      Septembre 2020

Jury:

Président	<b>BENOURED F.</b>	<b>Maitre de Conférences [A]</b>	<b>U. Mostaganem</b>
Encadreur	<b>BENNAMA R.</b>	<b>Maitre de Conférences [B]</b>	<b>U. Mostaganem</b>
Examineur	<b>SAIAH F.</b>	<b>Maitre de Conférences [B]</b>	<b>U. Mostaganem</b>



## Remerciements

Je tiens à remercier intensément et en tout premier lieu, ma directrice de mémoire **BENNAMA R**, Maître de conférences au département de biologie, pour avoir accepté de m'encadrer et pour le temps qu'elle a consacré aux nombreuses corrections du mémoire, pour ses conseils avisés, ses encouragements et surtout pour sa patience.

Je remercie respectueusement les membres du jury, **Dr. BENOURED F.** et **Dr. SAIAH F.**, Maîtres de conférences de l'université de Mostaganem, pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également aux techniciens et techniciennes au niveau des laboratoires du département de biologie, mes amies toutes sans exception, aussi à mes camarades de la promotion 2019-2020 du master en microbiologie appliquée; et que tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.

Mes vifs remerciements vont à tous mes enseignants qui ont contribué à ma formation durant mon cursus universitaire.

Je tiens d'exprimer mes sincères reconnaissances à mes très chers précieux parents pour leur aide et leur soutien moral pour la réalisation de ce modeste travail, merci d'avoir toujours cru en moi.

Je profite aussi pour remercier tout membre de ma famille *Saddok* et *Reguieg*.

En fin, je tiens à signaler que la partie expérimentale n'a pas pu être réalisée suite à la pandémie du covid-19 qui a amené à la fermeture subite de tous les locaux et les sites de l'université.

## Sommaire

<b>Résumé</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>iii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>iv</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>v</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>01</b>
<b>Partie I: Revue bibliographique</b>	
<b>I. Bactéries lactiques</b> .....	<b>03</b>
<b>I.1. Généralités</b> .....	<b>03</b>
<b>I.2. Principales voies métaboliques des bactéries lactiques</b> .....	<b>04</b>
<b>I.2.1. Métabolisme des sucres</b> .....	<b>04</b>
<b>I.2.2. Activité protéolytique</b> .....	<b>04</b>
<b>I.2.3. Autres activités métaboliques des bactéries lactiques</b> .....	<b>05</b>
<b>I.3. Critères de sélection des bactéries lactiques</b> .....	<b>07</b>
<b>I.3.1. Critères technologiques</b> .....	<b>07</b>
<b>I.3.2. Critères de sécurité</b> .....	<b>07</b>
<b>II. <i>Streptococcus thermophilus</i></b> .....	<b>09</b>
<b>II.1. Généralités</b> .....	<b>09</b>
<b>II.2.1. Métabolisme glucidique</b> .....	<b>10</b>
<b>II.2.2. Autres voies métaboliques de <i>Streptococcus thermophilus</i></b> .....	<b>11</b>
<b>III.3. Susceptibilité de <i>S. thermophilus</i></b> .....	<b>12</b>
<b>III.3.1. Notion de résistance</b> .....	<b>12</b>
<b>III.3.2. Résistance et sensibilité de <i>S. thermophilus</i> aux antibiotiques</b> .....	<b>14</b>
<b>Partie II: Présentation d'articles scientifiques</b>	
<b>Article 1: Susceptibility of <i>Streptococcus thermophilus</i> to antibiotics (Tosi et al., 2008)</b> .....	<b>15</b>
<b>Article 2: Antibiotic Resistance-Susceptibility Profiles of <i>Streptococcus thermophilus</i> Isolated from Raw Milk and Genome Analysis of the Genetic Basis of Acquired Resistance (Florez et Mayo, 2017)</b> .....	<b>27</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>49</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>51</b>



## Résumé

*Streptococcus thermophilus* est une bactérie lactique qui intervient dans la production de nombreux produits laitiers fermentés tels que le yaourt et les fromages. D'après la littérature la plus récente (Li *et al.*, 2019; Sirichoat *et al.*, 2020), cette espèce thermophile peut présenter une résistance aux antibiotiques et provoquer une éventuelle transmission de l'antibio-résistance aux microorganismes pathogènes du tractus gastro-intestinal. Un risque élevé de dissémination de la résistance est par ailleurs favorisé par la présence d'éléments génétiques mobiles (ex. Plasmides), qui constituent des vecteurs à grande capacité de transfert. Les articles de recherches de Tosi *et al.*, (2006) et Mayo et Florez, (2017) présentés dans le cadre de ce travail de master ont signalé chez différentes souches de *S. thermophilus* le phénomène de résistance aux antibiotiques incluant: la tétracycline, l'érythromycine, la streptomycine, la clindamycine et la néomycine. Tosi *et al.*, (2006) ont évalué la résistance aux antibiotiques des *S. thermophilus* étudiés au moyen de méthodes connues à savoir: micro-dilution, E-test et diffusion en gélose par la méthode de disques. Les deux premières méthodes sont basées sur la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). La méthode de micro-dilution s'est révélée plus fiable que celle du E-test. Cependant, la troisième méthode ne donne pas les valeurs des CMIs, mais elle est plus facile à réaliser et permet de distinguer les isolats résistants, en testant plusieurs antibiotiques à la fois. Les études moléculaires en relation s'intéressent à la définition du type et à la localisation génétique de la résistance observée sur des souches candidates à l'usage humain ou animal, afin d'évaluer leur statut sécuritaire. À cet égard, les travaux effectués par Florez et Mayo, (2017) ont conduit à l'identification de gènes de résistance codés par des séquences nucléotidiques (contigs) montrant une grande homologie avec des séquences dérivées de certains plasmides conjugatifs (*i.e.* pRE25, pSM19035). Par ailleurs, les ICEs (éléments intégratifs et conjugatifs) dont certains portent des gènes de résistance à l'érythromycine identifiés chez certains isolats ont des modules fonctionnels impliqués dans les processus de maintenance et de dissémination. En fin, sous des conditions similaires à celles de la fabrication et du stockage de laits fermentés de type yaourt, aucun transfert de gènes de résistance des isolats de *S. thermophilus* à *Lactobacillus delbrueckii* n'a été observé.

**Mots clés:** bactéries lactiques, *Streptococcus thermophilus*, antibiotiques, susceptibilité, résistance, méthode d'évaluation, CMI, gène de résistance, transfert de gènes.

### Abstract

*Streptococcus thermophilus* is a lactic acid bacterium used in the production of large types of fermented dairy products such as yogurt and cheeses. According to the most recent literature (**Li et al., 2019; Sirichoat et al., 2020**), this thermophilic species may be resistant to antibiotics and cause potential transmission of antibiotic resistance to pathogenic microorganisms of the gastrointestinal tract. A high risk of dissemination of resistance is also promoted by the presence of mobile genetic elements (*e.g.* Plasmids), which are vectors with high transfer capacity. The research papers of **Tosi et al., (2006)** and **Mayo & Florez, (2017)** presented as part of this master's work have reported in different strains of *S. thermophilus* the phenomenon of resistance to antibiotics including: tetracycline, erythromycin, streptomycin, clindamycin and neomycin. **Tosi et al., (2006)** evaluated the antibiotic resistance of the studied *S. thermophilus* by means of known methods namely: micro-dilution, E-test and diffusion in agar by the disk method. The first two methods are based on the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). The micro-dilution method has been shown to be more reliable than the E-test method. However, the third method, does not give the MICs, but is easier to apply and allows distinguishing resistant isolates, by testing several antibiotics at the same time. Molecular related studies are concerned with definition of the type and genetic localization of the resistance observed in candidate strains for human and animal use, in order to assess their safety status. In this regard, the work performed by **Florez and Mayo, (2017)** have led to the identification of resistance genes encoded by nucleotide sequences (contigs) showing a large homology with sequences derived from some conjugative plasmids (*i.e.* pRE25, pSM19035). Furthermore, the ICEs (integrative and conjugative elements) some of which carry genes for resistance to erythromycin identified in some isolates have functional modules involved in maintenance and dissemination process. Lastly, under conditions similar to manufacture and storage of yogurt-like fermented milks no transfer of resistance genes from *S. thermophilus* isolates to *Lactobacillus delbrueckii* has been observed.

**Key words:** Lactic acid bacteria, *Streptococcus thermophilus*, antibiotics, susceptibility, resistance, methods of evaluation, MIC, resistance gene, genes transfer.

**Liste des abréviations**

**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ARN** : Acide ribonucléique ribosomique  
**°C** : Degré Celsius  
**CIA** : Antibiotique d'importance critique  
**CMI** : Concentration minimale inhibitrice  
**CRISPR** : séquence palindromique courte répétitive régulièrement espacée  
**ECOFF** : Seuil écologique établi  
**EDTA** : acide éthylène diamine tétraacétique  
**EFSA** : Autorité européenne de sécurité des aliments  
**EMP** : Voie d'Emden-Meyerhof-Parnas  
**EPS**: Exopolysaccharide  
***erm(B)***: Gène de résistance de l'érythromycine à *S.thermophilus*  
**EUCAST** : Comité européen des tests de susceptibilité vers les antimicrobiens  
**FDA**: Food and Drug Administration (à vérifier)  
**GRAS**: Generally Recognized As Safe  
**ICE** : éléments intégratifs et conjugatifs  
**Kb** : kilo paire de base  
**Lb**: *Lactobacillus*  
**L**: *Listeria sp*  
**log<sub>2</sub>**: logarithme binaire  
**MLS** : Phénotype de résistance aux Macrolides, Lincosamides et Streptogramines  
**mm** : millimètre  
**MRS** : Gélose de Man, Rogosa et Sharpe  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**pb** : paire de base  
**PCR** : Polymerase chain reaction  
**PFGE** : Pulsed-Field Gel Electrophoresis  
**pH** : Potential d'hydrogène  
**PrtS** : enzyme responsable dans la dégradation de la caséine chez *S.thermophilus*  
**PrtBb** : enzyme responsable dans la dégradation de la caséine chez *Lb. bulgaricus*  
***Tet (S)*** : gène de résistance de la tétracycline à *S.thermophilus*  
**PTS** : Système phosphotransférase  
**P/V** : poids/volume  
**QPS** : Qualified Presumption of Safety  
**RAPD**: Amplification Aléatoire d'AND Polymorphe  
**rpm**: round per minute  
***S. thermophilus***: *Streptococcus thermophilus*  
**Sp**: Espèce non précisée  
**SSM** : Susceptibility test Medium  
**Subsp** : sous espèce  
**TBE** : tampon Tris-Borate-EDTA  
**UFC** : Unité formant colonies  
**UHT** : Stérilisation à haute température  
**WHO** : World Health Organization

---

**Tableaux cités dans l'article de Tosi et al., 2006**

<b>Tableau I:</b> Données descriptives des 74 isolats de <i>S. thermophilus</i> inclus dans cette étude.....	<b>18</b>
<b>Tableau II:</b> Distribution des CMI pour l'espèce <i>S. thermophilus</i> (64 souches) par les méthodes de micro-dilution, E-test et la diffusion en gélose par la méthode de disques.....	<b>22</b>
<b>Tableau III:</b> Concordance de CMI (limites d'agrément) comparant la méthode de référence de micro-dilution en bouillon et le E-test pour les 64 souches de <i>S. thermophilus</i> .....	<b>23</b>
<b>Tableau IV:</b> Seuils microbiologiques proposés pour les souches de <i>S. thermophilus</i> .....	<b>23</b>
<b>Tableau V:</b> Souches atypiques de <i>S. thermophilus</i> résistantes aux antibiotiques.....	<b>25</b>

**Tableaux cités dans l'article de Florez et Mayo, 2017**

<b>Tableau I:</b> Distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) déterminées par la méthode de micro-dilution en bouillon de 16 antibiotiques pour 41 souches de <i>S. thermophilus</i> isolées du lait cru .....	<b>34</b>
---	-----------

### Figures citées dans la revue bibliographique

<b>Figure 1:</b> Différentes formes de bactéries lactiques vues par microscope électronique à balayage.....	<b>2</b>
<b>Figure 2:</b> Principales voies métaboliques chez les bactéries lactiques.....	<b>5</b>
<b>Figure 3:</b> Catabolisme des glucides et les voies de synthèse des métabolites industriels pertinents.....	<b>10</b>
<b>Figure 4:</b> Surutilisation des agents antimicrobiens.....	<b>14</b>

### Figures citées dans l'article de Tosi *et al.*, 2006

<b>Figure 1:</b> Profils de PFGE des fragments de restriction de l'ADN chromosomique des <i>S. thermophilus</i> résistants obtenus par digestion avec Smal.....	<b>25</b>
---	-----------

### Figures citées dans l'article de Florez et Mayo, 2017

<b>Figure 1:</b> Analyse de Southern blot de l'ADN génomique total non digéré et digéré par Hind III et PstI des souches de <i>S. thermophilus</i> résistantes à la tétracycline <b>(A)</b> et l'érythromycine <b>(B)</b> , respectivement.....	<b>36</b>
<b>Figure :</b> Organisation génétique des ORFs dans le contig portant les gènes de résistance de la tétracycline tet(S) à partir de séquence de génome de <i>S.thermophilus</i> St-9 <b>(A)</b> et dans le contig portant les gènes de résistance erm(B) à partir du génome de <i>S.thermophilus</i> St-5 <b>(B)</b> .....	<b>39</b>
<b>Figure 3:</b> Alignement des compositions d'acides aminés déduites de l'rARN 16S guanine (5277)-N(7)-méthyltransférase codé par les gènes rsmG à partir de différentes souches de <i>S. thermophilus</i> de cette étude.....	<b>42</b>

# *Introduction*

## Introduction

Les bactéries lactiques sont présentes dans les aliments principalement dans les produits laitiers fermentés (Yaourt et le fromage). Comme ces bactéries peuvent facilement survivre au transit gastrique en traversant le tractus gastro-intestinal, elles peuvent donc enrichir les populations intestinales de bactéries lactiques **(Pessione, 2012)**. Malgré leurs effets bénéfiques et positifs sur la santé de l'homme, ces bactéries peuvent aussi être un danger pour son état, surtout lorsqu'il s'agit de modification dans son génome voire le développement de gènes de résistance aux antibiotiques **(Alvarez-Cisneros & Ponce-Alquicira, 2019)**.

Les bactéries lactiques forment un groupe de microorganismes producteur d'acide lactique à partir de diverses source de carbone **(Castillo Martinez et al., 2013)**, hétérogène de côté physiologique et morphologique **(Zhu et al., 2009)**, dont l'espèce *Streptococcus thermophilus*. Cette espèce thermophile est employée dans des procédés de fermentation industrielle pour la production du fromage, du yaourt et d'autres produits alimentaires, elle contribue dans l'amélioration des caractères organoleptiques de produit fini **(Giraffa et al., 2001)**, en produisant des vitamines, des acides organiques, des acides aminés et des exopolysaccharides (EPS) **(Qiao et al., 2020)**.

La résistance des bactéries aux antibiotiques constitue un problème global, surtout, lorsque les gènes de résistance seront transférable des bactéries commensales vers les bactéries pathogènes présentes dans le tractus gastro-intestinal **(Egervarn et al., 2010)**. Les gènes de résistance se transmettent facilement via les éléments génétiques mobiles **(Stsepetova et al., 2017)** et les bactéries lactiques dont *S. thermophilus*, peuvent être un réservoir de gènes de résistance, même avec leur statut de sécurité GRAS (Generally Recognized as Safe) **(Ishihara et al., 2013 ; Silva et al., 2019)**.

Etant donné que les phénomènes de résistance aux antibiotiques peuvent atteindre le corps humain directement via l'alimentation ou indirectement via la chaîne de production alimentaire, il demeure important de vérifier et de suivre au fur et à mesure la résistance de ces espèces aux antibiotiques **(Mathur & Singh, 2005)**.

Pour ces motifs, le thème de ce mémoire s'est intéressé à la détermination des profils de susceptibilité aux antibiotiques d'une collection de souches de *S. thermophilus* d'origines diverses. Mais, il à noter que la partie expérimentale n'a pas pu être réalisée, à l'exception de quelques manipulations relatives à la préparation des milieux de culture (milieux M17 et MRS) et à la réactivation des souches de *S. thermophilus* conservées à l'état congelé.

Les causes liées à l'interruption des travaux de la partie expérimentale sont très connues et concernent l'avènement et la propagation de la pandémie du Covid-19.

Suite à ces circonstances, il a été décidé d'organiser le mémoire en deux parties:

**La partie revue bibliographique :** elle englobe les titres traitant le sujet de ce mémoire, à savoir: les bactéries lactiques, l'espèce *S. thermophilus*, la notion de résistance aux antibiotiques et la susceptibilité de *S. thermophilus* aux antibiotiques.

**La partie présentation d'articles :** Dans cette partie deux articles de recherche en relation avec le thème du mémoire ont été choisis pour être présenté, afin de fournir des informations sur le sujet et conférer davantage de crédibilité scientifique à ce mémoire.



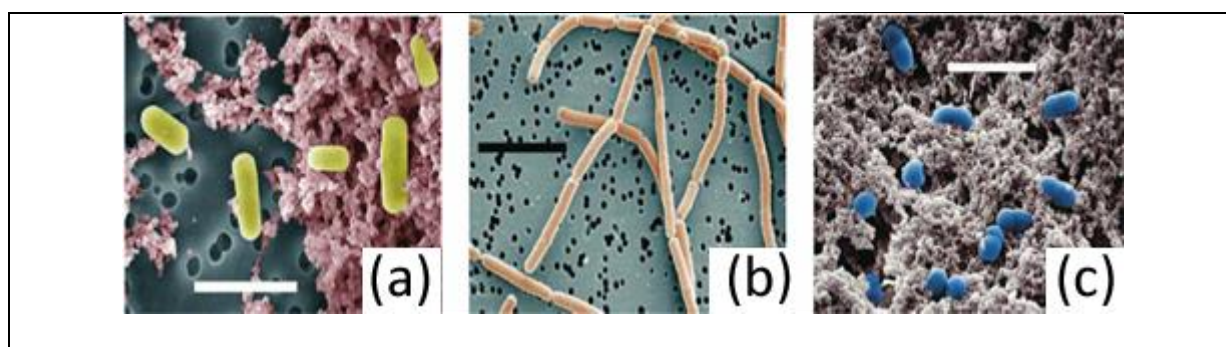
# *Revue Bibliographique*

## I. Les Bactéries lactiques

### I.1. Généralités

Les bactéries lactiques forment un groupe de microorganismes ubiquitaires qui se trouvent dans diverses niches écologiques, à savoir le sol, l'air, le corps humain et animal, plus précisément dans le tractus gastro-intestinal et uro-génital, et également dans les aliments comme le lait, la viande et les végétaux (Carr et al., 2002; Liu et al., 2014). Ce groupe comprend des coques et des bâtonnets (Figure 1), Gram positif, immobiles, asporulés, dépourvus de cytochromes et de catalase, anaérobies ou aéro-tolérants, tolérant l'acidité (environ  $\text{pH} < 5$ ), ce qui leur permet d'inhiber les microorganismes indésirables qui les entourent (Liu et al., 2014; Hatti-Kaul et al., 2019). En outre, les bactéries lactiques appartiennent à l'embranchement des Firmicutes, la classe des Bacilli et l'ordre des Lactobacillales regroupant les genres suivants : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconstoc*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*, tous caractérisés par une faible teneur en guanine – cytosine (31–49%) (Horvath et al., 2009; Liu et al., 2014).

Les bactéries lactiques sont réputées essentiellement par la production de divers métabolites entrant dans l'industrie alimentaire comme, les acides organiques en particulier l'acide lactique, des composés aromatiques, des vitamines et des exopolysaccharides (EPS) (Torino et al., 2015; Ruiz-Rodriguez et al., 2019).



**Figure 1 :** Différentes formes de bactéries lactiques vues par microscope électronique à balayage : (a) *Lactobacillus helveticus*, (b) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, (c) *Lactococcus lactis* (Willey et al., 2014).

## I.2 Principales voies métaboliques des bactéries lactiques

### I.2.1 Métabolisme des sucres

Les bactéries lactiques utilisent favorablement le glucose comme source essentielle de carbone et d'énergie (Axelsson, 2004; Buron-Moles et al., 2019). Elles peuvent être homo-fermentaires, en réalisant la fermentation homolactique en deux étapes, la première inclut la glycolyse ou la voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) où le glucose est transformé en acide pyruvique, puis ce dernier est réduit en acide lactique par la réduction du NADH, H<sup>+</sup>. Elle se fait essentiellement par *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et certains genres de *Lactobacillus*. Quand elles sont hétéro-fermentaires, c'est la fermentation hétérolactique qui s'accompagne de la production d'acide lactique et d'autres métabolites. Dans cette voie, *Leuconostoc*, *Weissella* et certains genres de *Lactobacillus* commencent par la dégradation du glucose par une cascade de réactions appelée la voie pentose phosphates, en libérant le CO<sub>2</sub> et en donnant du xylulose-5-phosphate qui sera scindé en deux métabolites; le glycéraldéhyde-3-phosphate et l'acétyl-phosphate. Par la suite, le glycéraldéhyde rentre dans la voie (EMP) pour produire de l'acide lactique, tandis que l'acétyl-phosphate est converti en deux parties, la première donne l'éthanol par l'intermédiaire de l'acétyl-CoA et l'autre donne de l'acide acétique (Figure 2) (Kandler, 1983; Castillo Martinez et al., 2013 ; Hatti-Kaul et al., 2018).

### 1.2.2 Activité protéolytique

Les bactéries lactiques nécessitent des apports exogènes en acides aminés ou peptides (Desmazeaud, 1983; Toe et al., 2019), qui sont fournis par la protéolyse de la caséine, comme étant la protéine la plus abondante du lait et une source principale d'acides aminés (Figure 2). De manière générale, l'utilisation de la caséine par les bactéries lactiques est initiée par des protéinases (Savijoki et al., 2006 ; Steele et al., 2013), ce sont des enzymes qui se trouvent dans la paroi cellulaire des bactéries lactiques comme *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbruecki subsp.lactis* et *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*, *Lactococcus lactis* (Gagnaire et al., 2004; Sanlier et al., 2017). Ces enzymes ont pour rôle d'hydrolyser les protéines en oligopeptides pour qu'elles soient dégradées en peptides courts ou acide aminés par les peptidases intracellulaires (Wu et al., 2017; Rodriguez-Serrano et al., 2018). Les acides aminés libres produits par les réactions de protéolyse participent dans l'amélioration du goût et de la texture des produits laitiers

fermentés (**Chen et al., 2017; Ozer et Kesekas, 2019**). De plus, les acides aminés ont rôle dans la protection des bactéries lactiques et l'amélioration de la résistance contre le stress environnemental comme la pression osmotique et l'acidité (**Baliarda et al., 2003; Tsakalidou et Papadimitriou, 2011**).

### **I.2.3. Autres activités métaboliques des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques ont une activité lipolytique pauvre par rapport aux autres microorganismes. Elles peuvent hydrolyser des triglycérides en donnant des acides gras libres, du glycérol et des intermédiaires de mono- et diglycérides (**Garcia-Cano et al., 2019**). Le degré de lipolyse chez les bactéries lactiques permet de déterminer la sélection des souches comme cultures starters ou ferments lactiques. Cette propriété est extrêmement pertinente pour la fermentation des légumes, les applications d'aliments cuits au four et le développement d'arômes dans les produits laitiers fermentés (**Tanasupawat et al., 2015; Garcia-Cano et al., 2019**).

Les bactéries lactiques sont également capables d'utiliser le citrate (**Hugenholtz, 1993**). Le métabolisme du citrate a été largement étudié chez les bactéries lactiques, car il contribue de manière significative à la croissance et à la résistance au stress acide (**Martin et al., 2005**). La première enzyme impliquée dans le métabolisme du citrate est la citrate perméase qui permet le transport de celui-ci vers l'intérieur de la cellule. Elle est fonctionnelle aux pH inférieur à 6 et son optimum est à pH 5. A l'intérieur de la cellule, le citrate est transformé en acétate et en oxaloacétate par la citrate-lyase (autrement appelée citratase) (**Hermier, 1992**). L'oxaloacétate produit au cours de ces réactions est ensuite converti en pyruvate et CO<sub>2</sub> par une oxaloacétate-décarboxylase. La suite des réactions conduit principalement à la production d'acétoïne et du di-acétyle (**Figure 2**). Ces composés qualifiés d'aromatiques, jouent un rôle dans le développement de la saveur des produits laitiers fermentés, en particulier le beurre et les fromages (**Hugenholtz, 1993; Mastrigt et al., 2018**).



### I.3. Critères de sélection des bactéries lactiques

#### I.3.1. Critères technologiques

La majorité des bactéries lactiques sont utilisées comme cultures starters et auxiliaires pour contrôler les fermentations alimentaires, en contribuant au profil organoleptique et textural de nombreux aliments, tandis que d'autres sont utilisées comme probiotiques pour la prévention et le traitement, en particulier des maladies intestinales (Saez-Lara et al., 2015; Sirichoat et al., 2020). Les bactéries lactiques utilisées comme cultures starters dans la transformation du lait sont sélectionnées en fonction de leurs propriétés technologiques et sécuritaires. La capacité de ces bactéries à acidifier est l'une des caractéristiques technologiques les plus importantes pour une culture starter potentielle. Une acidification rapide de la matière première (Lait) empêche la croissance des microorganismes indésirables et est également essentielle pour le développement de l'arôme, la texture et la saveur du produit fini (Marshall et Tamime, 1997; De vuyst, 2000). Cette acidification en relation avec la production d'acide lactique en tant que métabolite majeur de la fermentation des glucides contribue donc à la formation des composés d'arôme (e.g. acétoïne et di-acétyle) (Figure 2) dans les produits laitiers fermentés. De même, elle joue un rôle important dans le développement de la texture des produits laitiers fermentés, en particulier celle du yaourt (Marshall et Tamime, 1997). Par ailleurs, la présence de souches productrices d'EPS permet aussi d'améliorer la stabilité de la texture du yaourt et certains types de laits fermentés (Ruas-Madiedo et al., 2002; Kumari et al., 2016).

Un autre critère qui caractérise les bactéries lactiques autant qu'un participant important dans l'industrie alimentaire est celui de la production de vitamines, c'est le cas de *Lactococcus lactis* et *S. thermophilus* qui ont la capacité de produire des vitamines telles que: la riboflavine (vitamine B2) et les folates (vitamine B9), respectivement (Chaves et al., 2002; Burgess et al., 2004; Meucci et al., 2018).

Les critères de sélection des cultures starters peuvent aussi avoir un lien avec leurs activités lipolytiques et protéolytiques. Il a été démontré que les métabolites produits contribuent à la synthèse d'arômes dans les produits laitiers comme le fromage, grâce aux lipases et aux estérases. Ainsi, les enzymes protéolytiques responsables de l'hydrolyse de la caséine peuvent conduire de l'amertume au cours de l'affinage du fromage (Olson et al., 1990; McSweeney et al., 2000; Dominogo-Lopes et al., 2017).

### I.3.2. Critères de sécurité

L'autre critère le plus important pour les souches lactiques à caractère technologique concerne leur aspect sécuritaire, car même si une bactérie lactique montre des aspects technologiques intéressants, et elle ne répond pas aux critères sécuritaires, elle ne pourra pas faire l'objet d'une exploitation alimentaire. Pour ces considérations, il est à noter que les bactéries lactiques en général et les probiotiques en particulier sont soumis à des réglementations contenues dans la législation alimentaire générale, selon lesquelles ils doivent être sans danger pour la santé humaine et animale. Aux États-Unis, les micro-organismes utilisés à des fins de consommation devraient avoir le statut GRAS (Generally Regarded As Safe : microorganismes sécuritaire de grade alimentaire), réglementé par la FDA (Food and Drug Administration). Par ailleurs, selon l'EFSA (L'Autorité européenne de sécurité des aliments), toutes les souches de bactéries lactiques doivent avoir le statut QPS (Qualified Presumption of Safety: Présomption d'innocuité reconnue) (EFSA, 2018). Pour ces raisons, les bactéries lactiques utilisées en industrie alimentaire doivent être dépourvues de tout risque susceptible d'entraîner des maladies d'origine alimentaire (Karacaer et al., 2017). Elles ne doivent pas exprimer des caractéristiques de virulences associées à l'adhésion, la translocation et la disparition de la réponse immunitaire de l'hôte, c'est le cas, par exemple du genre *Enterococcus* (Braiek et Smaoui, 2019). Les gènes de virulence sont connus pour être associés à certains plasmides hautement transmissibles (Eaton et al., 2001 ; De-Castilho et al., 2019). De plus, les bactéries lactiques avec le " statut QPS" accordé doivent être sensibles aux antibiotiques, et dépourvues de toutes antibio-résistances acquises qui pourraient être transférées à des bactéries opportunistes et pathogènes (EFSA, 2018; Sirichoat et al., 2020). Dans ce contexte, il a été rapporté que la résistance intrinsèque et la résistance par mutation sont peu susceptibles d'être disséminées, tandis que les gènes acquis horizontalement, en particulier ceux portés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides et transposons) sont les plus susceptibles d'être transmis (Normark et Normark, 2002; Flórez et al., 2008). En effet, les bactéries lactiques résistantes aux antibiotiques peuvent être rencontrées dans des environnements où elles entrent en contact avec des antibiotiques, comme le pis de vaches traitées aux antibiotiques (Chopra et Roberts, 2001) ou les denrées alimentaires et les aliments pour animaux contenant des résidus d'antibiotiques (Donoghue, 2003; Flórez et al., 2008).

En revanche, les critères de sélection des souches probiotiques concernent d'une part leurs aspects probiotiques et leurs caractéristiques technologiques et sécuritaires d'autre part **(Ammor et Mayo, 2007; Vilander et Dean, 2019)**. Selon l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA : the Food and Drug Administration) et WHO (World Health Organization), les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants pouvant apporter des bienfaits à la santé de l'hôte lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates **(Gupta & Garg, 2009 ; Shokryazdan et al., 2017)**. Parmi ces effets bénéfiques figurent : le rétablissement du microbiote intestinal, la production des substances antimicrobiennes et l'amélioration des réactions du système immunitaire **(Masood et al., 2010 ; Zielinska & Kolozyn-Krajewska, 2018)**.

## II. *Streptococcus thermophilus*

### II.1. Généralités

L'espèce *S. thermophilus* appartient au genre *Streptococcus*, elle a été re-classifiée avec les streptocoques viridans dans le groupe salivarius. Les espèces du groupe viridans ne possèdent pas les antigènes de Lancefield et leur pouvoir de pathogénicité est faible **(Kawamura et al. 1995; Facklam, 2002)**.

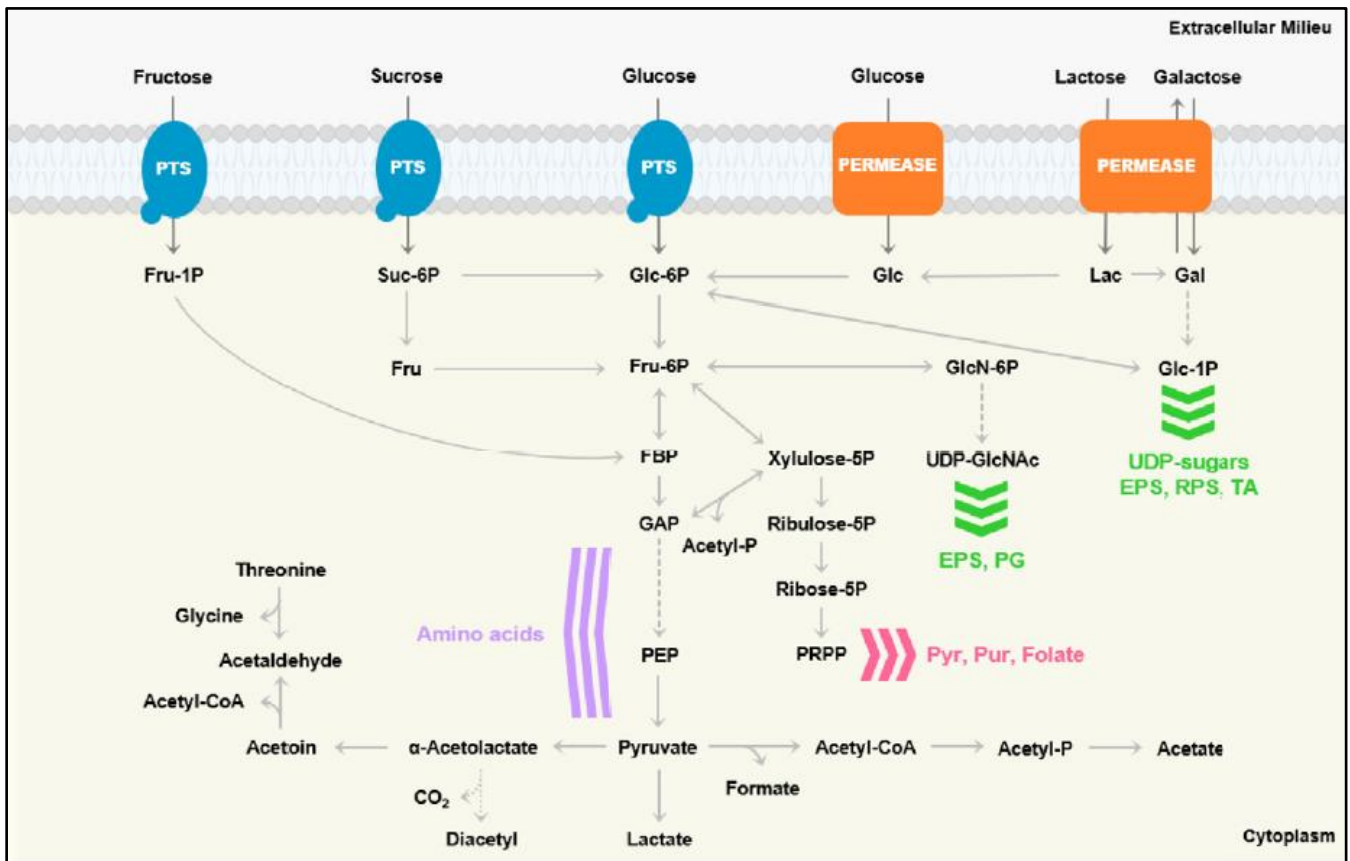
*S. thermophilus* est en effet, une exception dans le genre *Streptococcus*, car c'est la seule espèce qui n'est pas pathogène, et réputée par son statut GRAS **(Liu et al., 2014)**. Tous les isolats de *S. thermophilus* sont identifiés comme anaérobies, aérotolestants, catalase négative et Gram-positif. Leurs cellules ovoïdes se développent généralement en chaînes linéaires. Ils sont Incapables de croître à 10°C, à pH 9,6 ou en présence de 6,5% de NaCl **(Delorme, 2008; Iyer et al., 2010)**. Il s'agit, par ailleurs, d'une espèce thermophile, ayant une température d'incubation optimale au-dessus de 40°C.

Le *S. thermophilus* est largement utilisé en combinaison avec *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. Lactis* et /ou *Lb. helveticus*, en tant que culture starter pour le yaourt et autres produits laitiers fermentés, ainsi que pour les fromages de type Suisse et Italien **(Hols et 2005; Iyer et al., 2010)**.



### II.2.1. Métabolisme glucidique

La première fonction de *S. thermophilus* dans la fermentation des produits laitiers industriels est la conversion rapide du lactose en lactate à des températures élevées. Il est connu que *S. thermophilus* a une capacité limitée d'utiliser les hydrates de carbone. Cinq différents sucres sont fermentés par *S. thermophilus* : le lactose, le saccharose, le glucose, le galactose et le fructose. Les deux derniers sucres sont utilisés par un nombre limité de souches. Chez *S. thermophilus*, le saccharose et le fructose sont les seuls sucres transportés par un système phosphotransférase dépendant du phosphoénolpyruvate (PTS-PEP), mais avec un rendement inférieur à celui du lactose (**Figure 3**) (**Van Den Bogaard et al. 2004; Hols et al. 2005**). En outre, le glucose est un sucre non-PTS chez *S. thermophilus* et la plupart des souches de cette espèce se développent faiblement sur le glucose. Par contre, *S. thermophilus* est fortement adapté à la croissance sur le lactose, qui est transporté dans la cellule par l'intermédiaire d'une perméase (figure 3), et son métabolisme comprend l'hydrolyse par une  $\beta$ -galactosidase, puis la dégradation du glucose et du galactose, selon les voies de la glycolyse et de Leloir, respectivement. Bien que toutes les souches utilisent le glucose fragmenté du lactose. Le galactose est généralement non métabolisé et expulsé à l'extérieur de la cellule (**Hols et al. 2005; Iyer et al. 2010**). Chez *S. thermophilus*, le métabolisme des glucides est étroitement lié à la production des EPS, car il fournit les précurseurs nucléotidiques activés nécessaires à leur biosynthèse. Des approches transcriptomiques récentes confirment ce point de vue, montrant que des niveaux élevés de biosynthèse d'EPS sont atteints par une régulation positive des gènes impliqués dans le métabolisme du sucre (**Wu & Shah, 2018; Markakiou et al, 2020**).



**Figure 3** : Catabolisme des glucides et les voies de synthèse des métabolites industriels pertinents (Markakiou et al., 2019).

### II.2.2. Autres voies métaboliques de *Streptococcus thermophilus*

*S. thermophilus* se caractérise par un faible pouvoir protéolytique et la présence d'un système protéolytique chez certaines souches permet d'hydrolyser un grand nombre de protéines comme la caséine, en courts peptides et en acides aminés (Iyer et al. 2010; Settachaimongkon et al., 2014). La dégradation de la caséine se fait par une enzyme particulière ancrée à la paroi cellulaire, appelée "PrtS". De même, il a été démontré que cette enzyme perd sa fonctionnalité quand *S. thermophilus* se trouve dans une culture mixte. Par exemple, dans la fermentation du yaourt, la protéinase PrtBb de *Lb. bulgaricus*, qui prend le rôle devient essentielle pour la croissance de *S. thermophilus*. En outre, le transfert des acides aminés et les oligopeptides à travers la membrane cellulaire pour être utilisés par les cellules, ne nécessite pas beaucoup d'énergie chez *S. thermophilus*, en raison d'une faible activité des peptidases, qui ont un rôle dans la libération des acides aminés essentiels pour la croissance de la bactérie (Hafeez et al., 2013; Rodriguez Serrao et al.,

**2018).** Comme de nombreuses bactéries lactiques, *S. thermophilus* produit des acides aminés, pour satisfaire ses besoins en sources d'azote pendant la croissance dans le lait. Ainsi, plusieurs acides aminés ont été trouvés produits par *S. thermophilus*, dont la cystéine, la méthionine, le glutamate, l'aspartate, l'alanine et le glutathion (**Hong et al., 2015; Qiao et al., 2018**).

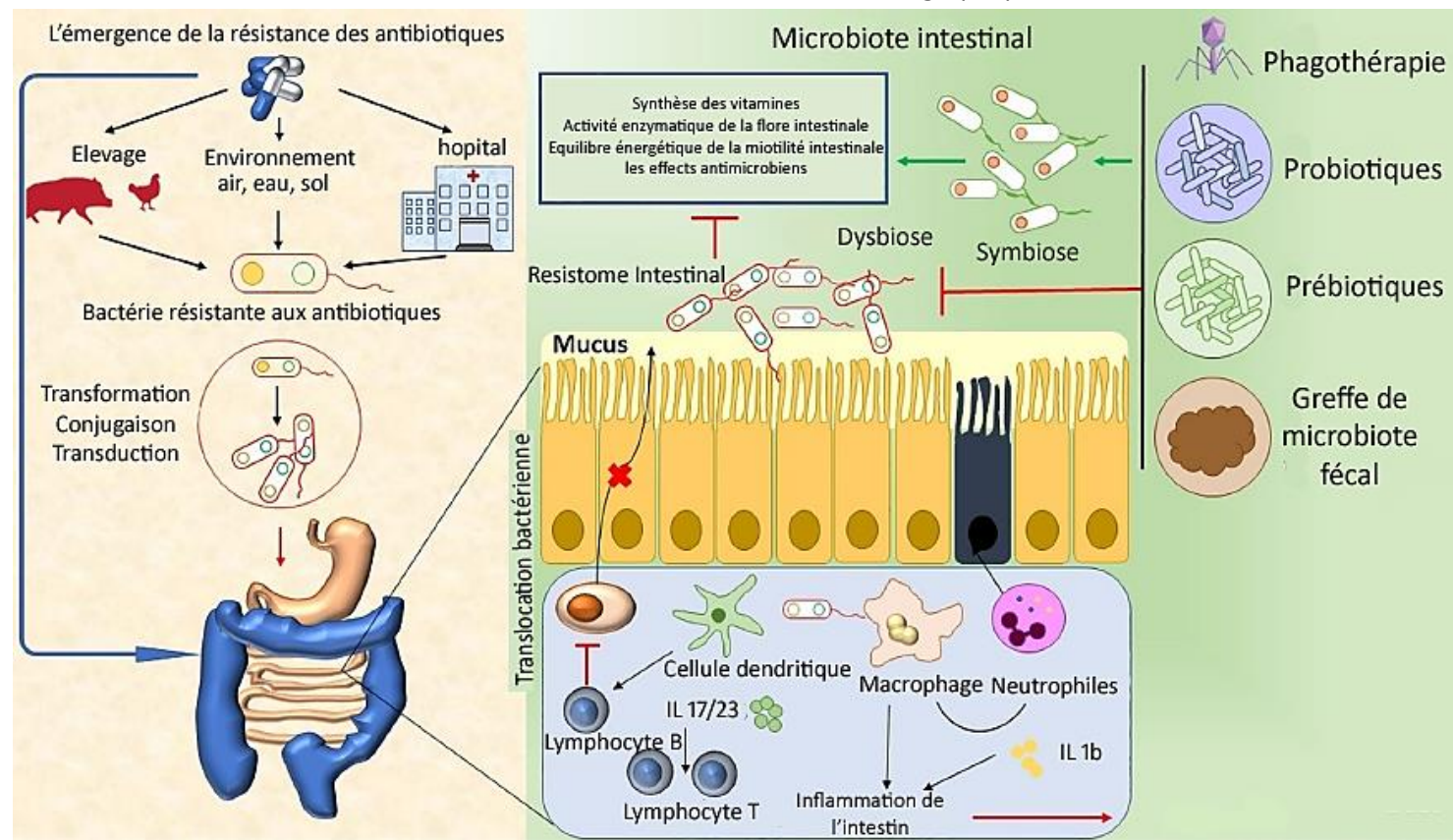
Par ailleurs, *S. thermophilus* se caractérise par la présence de l'enzyme uréase, connue pour sa capacité à catalyser l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone. L'uréase produite par *S. thermophilus* est considérée fournir du CO<sub>2</sub> à *Lb. bulgaricus* et stimule son acidification (**Mora et al., 2005; Yamauchi et al., 2019**). Cependant, il existe des rapports contradictoires concernant le rôle de l'uréase dans la fermentation du yogourt notamment ceux publiés par **Mora et al. (2004)** et **Arioli et al. (2017)**. Ces auteurs ont proposé que l'ammoniac généré par l'uréase de *S. thermophilus* avait un effet tampon qui réduisait le taux de diminution du pH et diminuait le taux d'acidification dans la co-culture de *S. thermophilus*– *Lb. bulgaricus*. Étant donné que les deux études ont abouti à des conclusions différentes et n'ont utilisé qu'une ou deux souches en culture, il est impossible de tirer une conclusion générale sur l'importance de l'uréase (**Yamauchi et al., 2019**).

### **II.3. Susceptibilité de *S. thermophilus* aux antibiotiques**

#### **II.3.1. Notion de résistance**

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la résistance aux antibiotiques est définie par «une augmentation de la concentration minimale inhibitrice d'un composé inhibiteur pour une souche précédemment "sensible". Cette définition de la résistance aux antibiotiques est ad hoc pour la microbiologie clinique, mais néglige les concepts de résistance intrinsèque ou de gènes de résistance, naturellement présents dans différents environnements (**Figure 4**) (**Allen et al., 2010; Nesme and Simonet, 2015**).

Lorsque la résistance à un antimicrobien est inhérente à une espèce bactérienne, elle est généralement appelée «résistance intrinsèque» (parfois appelée «résistance naturelle») et est typique de toutes les souches de cette espèce. En revanche, lorsqu'une souche d'une espèce généralement sensible est résistante à un médicament antimicrobien donné, elle est considérée comme une «résistance acquise». La résistance acquise peut avoir diverses origines (**Figure 4**). Elle peut être due soit à des gènes ajoutés (gènes acquis par les bactéries via le gain d'ADN exogène), soit à la mutation de gènes indigènes (**EFSA, 2012**).



**Figure 4 :** La surutilisation des agents antimicrobiens (environnement, hôpital ou animal) a entraîné une perturbation au niveau du microbiote (microbiome) intestinal. Cela a abouti au dysfonctionnement du mucus et l'augmentation de la translocation bactérienne. Ces bactéries favorisent l'activation des cellules dendritiques et des macrophages par les motifs moléculaires associés aux microorganismes pathogènes (MAMP) à travers les récepteurs de type Toll (TLRs). Par conséquent, ils induisent la chimiotaxie des neutrophiles et la production d'IL. L'inflammation locale entraîne l'altération des cellules épithéliales. Les APC présentent les antigènes pour initier et maintenir les réponses des lymphocytes T et les lymphocytes B inhibent la production par les cellules plasmiques IgA. Au final, l'activation du système immunitaire stimule l'inflammation, qui conduit aux maladies chroniques. L'approche thérapeutique, comme la phagothérapie, l'usage des aliments enrichis de probiotiques et prébiotiques et la greffe du microbiote fécal (FMT), possède la possibilité de cibler des taxons bactériens spécifiques, contribuant ainsi à rétablir l'homéostasie et l'équilibre du microbiome (Tsikalou et al., 2020).

### II.3.2. Résistance et sensibilité de *S.thermophilus* aux antibiotiques

*S. thermophilus* est considéré comme un ferment ajouté aux denrées alimentaires (**Delorme, 2008**). Cependant, plusieurs gènes de résistance ont été trouvés dans le génome de *S. thermophilus* (**Silva et al., 2019**). Une étude menée en Italie, des gènes de résistance à l'érythromycine, la streptomycine et la tétracycline ont été trouvés dans son génome, mais aucun transfert de gènes n'a été détecté (**Rizzoti et al., 2009**). Une autre étude a révélé une résistance intrinsèque de *S. thermophilus* vers la kanamycine, la streptomycine et la triméthopime (**Tarrah et al., 2018**). Dans d'autres expériences réalisées, la bactérie était sensible également à certains nombre d'antibiotiques, comme il a été montré par **Rossetti et al. (2009)**, la sensibilité a été trouvée envers la vancomycine, la gentamicine, la tétracycline et l'érythromycine. Aussi, à la triméthopime (**Kushiro et al., 2009**). Autres travaux (**Ammor et al., 2007**) ont prouvé que *S. thermophilus* est souvent sensible à la tétracycline, le chloramphénicol, l'érythromycine, la céfalotine et l'ensemble de la quinupristine-dalfopristine. En outre, il est indispensable de vérifier le type de résistance par des méthodes de biologie moléculaire, car la souche peut avoir une résistance intrinsèque où le transfert des gènes de résistance est quasiment inexistant (**Karapetkov et al., 2011**). *S.thermophilus* peut acquérir les gènes de résistance principalement à cause de la présence des résidus des antibiotiques dans les produits laitiers, qui pourraient affecter la fermentation ou affecter de manière directe le corps humain (**Figure 4**) (**Acar-Soykut et al., 2018**).

# *Présentation d'articles scientifiques*

**Article 1:** Susceptibility of *Streptococcus thermophilus* to antibiotics. Tosi L., Berruti G., Danielsen M., Wind A., Huys G., & Morelli L., 2007. *Antonie van Leeuwenhoek*, **92**: 21-28.

**Article peut être téléchargé sur:**

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17151954/>

### **Description de l'étude**

- Cette étude qui traite de la détermination de la résistance ou de la sensibilité de *S. thermophilus* aux antibiotiques a été effectuée par Tosi et ses collaborateurs de l'institut de microbiologie, de l'université Cattolica del Sacro Cuore à Piacenza, Italie; du laboratoire de microbiologie de l'université de Ghent, Belgique et le département de la caractérisation moléculaire de la souche de Chr. Hansen à Horsholm, Danemark. Elle a été publiée en 2006 dans le journal *Antonie van Leeuwenhoek*.

### **Justification du choix de l'article**

Ce premier article a été choisi pour être présenté car il est pertinent par rapport au sujet du mémoire. De plus, la démarche proposée pour évaluer la susceptibilité aux antibiotiques est intéressante dans la mesure où trois méthodes différentes ont été suivies (un protocole riche en matière de méthodes proposées).

**Remarque:** L'article sera présenté en respectant son contenu scientifique et sa structure de base dans l'ordre: résumé, matériel & méthodes, résultats & discussion et conclusion.

### **1. Résumé**

Le résumé a été décrit d'une façon condensée par les auteurs, il rapporte sur l'évaluation de la susceptibilité aux antibiotiques de 74 isolats de *S. thermophilus* collectés de différents environnements entre 1948 et 2005, au moyen de méthodes connues à savoir: micro-dilution, E-test et diffusion en gélose par la méthode de disques. Les auteurs ont affirmé que la méthode de micro-dilution a fourni meilleure performance que la méthode d'E-test. Ils ont trouvé que la plupart des souches étaient sensibles à tous les antibiotiques testés alors que quelques certaines étaient résistantes à l'érythromycine, la tétracycline et la streptomycine. De plus, ils ont développé un nouveau milieu de culture, qui est un mélange de Iso-sensitest (90% V/V) et du milieu M17 (10% V/V) additionné de lactose (0,5 P/V). La concordance globale entre les techniques était bonne à l'exception de la tétracycline, pour

laquelle le E-test a fourni des CMI inférieures que les méthodes de micro-dilution. La plupart des souches étaient sensibles à tous les antibiotiques testés, cependant, quelques souches résistantes à l'érythromycine, à la tétracycline et à la streptomycine ont été détectées.

## 2. Introduction et objectifs

Les auteurs ont fait un rappel bibliographique sur l'importance de *S. thermophilus* en tant que ferment lactique utilisé en particulier dans la fabrication de nombreux produits laitiers (yaourt, différents types de fromage) (Fox, 1993; Chausson & Maurisson 2002). Par ailleurs, ils ont indiqué et en se basant sur les travaux de Wang *et al.* (2005) que cette espèce pourrait un vecteur majeur des déterminants de la résistance aux antibiotiques dans les fromages de détail, ce qui suggère que la fermentation du fromage est un processus sensible au cours duquel des bactéries résistantes aux antibiotiques pourraient évoluer et proliférer. Les auteurs ont par ailleurs signalé que *S. thermophilus* est un organisme non-pathogène pour lequel la présence de gènes de résistance aux antibiotiques acquis en elle-même ne pose pas de risque clinique significatif. Cependant, la possibilité que les cultures de *S. thermophilus* puissent transférer des gènes de résistance aux antibiotiques à des espèces pathogènes présentes dans les aliments ou dans le tractus gastro-intestinal (y compris les entérocoques, les streptocoques et la listeria) représente un risque clinique potentiel qui doit être soigneusement évalué. Pour justifier le cadre de cette recherche, les auteurs ont souligné qu'il est important d'évaluer le niveau de résistance intrinsèque à une gamme d'agents microbiens pertinents afin de différencier les souches présentant des caractères de résistance typiques des souches sûres (safe) pouvant être utilisées pour la production laitière. Ensuite, ils ont cité les différentes méthodes utilisées dans ce type d'évaluation avant de revenir pour cerner le but de leur étude qui a concerné 74 isolats de *S. thermophilus*.

## 3. Matériels et méthodes

La démarche expérimentale proposée par les auteurs a comporté deux grands aspects: un aspect relatif aux isolats testés incluant leurs conditions de culture et leur identification moléculaire. L'autre aspect de l'étude a ciblé les méthodes d'évaluation de la susceptibilité des isolats aux antibiotiques. Notons que les tests de susceptibilité de *S. thermophilus* aux



antibiotiques ont été effectués par trois différentes méthodes: micro-dilution, E-test et diffusion en gélose par la méthode des disques.

### 3.1 Milieux de culture

Pour le test de susceptibilité aux antibiotiques, un nouveau milieu a développé appelé *S. thermophilus* sensitive medium (SSM), il est composé de 90% (V/V) du milieu Iso-sensitest plus 10% (V/V) du milieu M17 et 0.5% (P/V) de lactose. Les milieux M17, MRS, Iso-Sensitest, Mueller Hinton et les milieux combinés suivants: Mueller Hinton 90% V/V plus MRS 10% V/V; Iso-Sensitest 90% V/V plus MRS 10% V/V; Mueller Hinton 90% V/V plus Iso-sensitest 10% V/V; Mueller Hinton 90% V/V plus M17 10% V/V ont été utilisés avec ou sans supplémentation en lactose à 0.5% (P/V) dans les tests de croissance et dans d'autres expériences. Tous les milieux purs ont été obtenus auprès d'Oxoid (Oxoid Ltd., Basingstoke, Royaume-Uni)

### 3.2. Souches bactériennes

Comme il a été signalé dans le résumé de l'article, l'étude a utilisé 74 isolats de *S. thermophilus* obtenus à partir de la collection de cultures de l'Istituto di Microbiologia U.C.S.C. (52 souches) et de différentes collections de cultures internationales (22 souches). Leurs sources et caractéristiques sont résumées dans le tableau I. Les souches résistantes aux antibiotiques ont été isolées à partir de lait cru sur des boîtes contenant des géloses M17 additionnées de tétracycline ( $2\mu\text{g ml}^{-1}$ ) ou d'érythromycine ( $1\mu\text{g ml}^{-1}$ ) ou les deux antibiotiques. L'identification des souches au niveau de l'espèce a été faite au moyen de PCR spécifiques à l'espèce (**Lick et al., 1996**). Les isolats ont été systématiquement cultivés à 42°C dans des jarres d'anaérobiose (Oxoid) et conservés à - 80°C.

**Remarque:** Jusqu'à présent l'emploi des mots : souches et isolats n'est pas homogène dans l'article. Les auteurs alternent entre isolat et souche.

### 3.3. Préparation d'ADN génomique pour PFGE (électrophorèse sur gel en champ pulsé)

La technique de l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) a été proposée à des fins taxonomiques (Typage moléculaire pour classer les isolats en souches). L'ADN génomique des cultures de *S. thermophilus* a été préparé comme décrit par **O'Sullivan et Gerald (1998)**. Trois ml d'une culture over-night ont été centrifugés à 14 000 trs /min pendant 5min, lavés une fois avec 50 mM d'EDTA (pH 8,5) et remis en suspension dans 1.5 ml du même tampon.

Une quantité de 150 µl de suspension cellulaire a été ajoutée à 750 µl d'agarose fondu à bas point de fusion à 1% (Bio-Rad, Richmond, CA) préparé dans du tampon TBE. Des inserts ont été préparés en distribuant des aliquotes de 250 µl de la suspension de cellules fondues dans des puits de moules à bouchon et en les laissant se solidifier à 4°C pendant 15 à 30 min. Les cellules ont été lysées *in situ* en immergeant les inserts dans 3 ml d'EDTA 50 mM contenant 10 mg ml<sup>-1</sup> de lysozyme et 0,05% (P/V) de N-lauryl sarcosine à 37°C pendant une nuit suivie d'une incubation pendant une nuit à 37°C dans 1% (P/V) SDS, Tris 10 mM, EDTA 0,5 mM (pH 8.5), contenant 2 mg ml<sup>-1</sup> de protéinase K (Sigma, Poole, Dorset, Royaume-Uni). Les inserts ont ensuite été lavés trois fois pendant 30 min à 4°C dans 4 ml d'EDTA 50 mM (pH 8.5) et stockés dans des solutions d'EDTA 0.5 M.

**Tableau I :** Données descriptives des 74 isolats de *S. thermophilus* inclus dans cette étude.

Isolats	Source d'isolement	Année de l'isolement
NCIMB 702516, NCIMB 702538, NCIMB 702510, NCIMB 702519, NCIMB 702504, NCIMB 702505, LMG 7953, NCIMB 7952, CNBL 1034	Lait pasteurisé	1947-1948
NCIMB 702392, NCIMB 702532 1951 NCIMB 702527, NCIMB 702525, NCIMB 702526	Lactosérum issu de la production de fromage Emmental	1951
LMG 13101 LMG 11164	Culture starter du fromage gruyère	1954
DSM 20479, LMG 13100		1956-1958
CNBL 1055, CNBL 1056, CNBL 1057 ; S 128, S 215, S 190, S 120, S 128, S 88, S 122, S 164, S 127	Fromage Crescenza d'Italie	1966-1969
B3	/	1969
S55	Lait pasteurisé	1966
LMG 18311	Yaourt commercial	1974
DSM 20617	Lait pasteurisé	1980
F 28, F 27, F 30, F 12, F 10, F 14, F 29	Yaourt commercial d'Italie	1995
2	Fromage Mozzarella d'Italie	1995
3	Lait	1995
5	Fromage Mozzarella d'Italie	1995
LMG 18240	ferment de fromage	1998
CCUG 45697	Fibrose kystique humaine	2001
CCUG 43382	Sang humain	2000
CNBL 1420, CNBL 1419, CNBL 1421	Lactosérum issu de la production de Grana Padano	2000
A, B, C, D, E	Lait cru d'Italie	2004
F, G, H, I, L, M, O	Lactosérum issu de la production de Grana Padano	2004
T1, T2, T3, E18, E2, E13, E14, E15, E17, S1, S2	Lait cru de Parama, Italie	2004
LMG : Bacteria Collection, Belgique. DSM : German Collection of Microorganisms and Cell Culture, Allemagne. CCUG : Culture Collection University of Goteborg, Suède. NCIMB: Culture Collection of Industrial Food and Marine Bacteria, UK. CNBL: National Collection Lactic Bacteria University of Piacenza, Italie.		

### **3.4. Restriction de l'ADN et les conditions de fonctionnement de PFGE**

A ce niveau, les restrictions d'endonucléase de l'ADN génomique de *S. thermophilus* ont été effectuées dans des sections de 3 mm de long coupées à partir d'inserts d'agarose en utilisant 20 U d'enzyme de restriction SmaI pendant 4h. L'ADN génomique restreint aux endonucléases dans des inserts d'agarose a été scellé dans des puits dans 1,0% de gels d'agarose de qualité PFGE (Bio-Rad) dans un tampon TBE 0.5X (Tris 45 mM, acide borique 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) et a été séparé à 180V pendant 20h à 14°C dans une unité d'électrophorèse CHEFDR-II PFG avec un mini refroidisseur modèle 1000 (Bio-Rad). Les conditions de fonctionnement du gel pour chaque digestion étaient: le temps de commutation 1–6 sec et une rampe linéaire. Les gels ont été colorés dans du bromure d'éthidium dans du TBE 0.5X pendant 30 min, décolorés et photographiés.

### **3.5 Test de susceptibilité par la méthode de micro-dilution**

La susceptibilité a été testée vis-à-vis de l'érythromycine, la streptomycine, la tétracycline, la clindamycine, la gentamicine et l'ampicilline qui ont été achetés auprès de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de micro-dilution en bouillon selon les protocoles de Clinical and Laboratory Standards Institute (**CLSI, 2005**). Tous les isolats ont été soumis à des tests de CMI dans un bouillon SSM dans une série de dilution au demi (½) allant de 0,03 à 256 µg.ml<sup>-1</sup>. Les microplaques contenant les antibiotiques ont été inoculées avec une concentration finale d'environ 5x10<sup>4</sup> UFC/ml. Les inoculum ont été préparés dans une suspension saline à partir de cultures cultivées pendant une nuit sur SSM. Tous les plateaux de micro-dilution ont été préparés en double et incubés à 42°C dans des conditions d'anaérobiose pendant 24h. La CMI a été lue visuellement comme recommandé par le NCCLS.

### **3.6 Test de susceptibilité par la méthode du E-test**

Le E-test (AB biodisk) a été utilisé conformément aux instructions du fabricant. Les auteurs ont indiqué qu'aucune méthode standard n'existe pour les tests de sensibilité de *S. thermophilus* et afin d'assurer une bonne croissance et donc des tests de sensibilité optimaux, les conditions suivantes ont été réunies. Une suspension avec une densité de McFarland 1 dans un tampon salin a été étalée par un coton-tige dans trois directions sur une boîte d'agar SSM de 4 mm d'épaisseur et recouverte d'une bande E-test. Les boîtes ont

été incubées dans des conditions d'anaérobiose pendant 24h à 42°C avant lecture. La CMI a été définie par l'intersection de la marge de l'ellipse de croissance avec la bande E- test.

### 3.7 Test de susceptibilité par la méthode des disques

Les sensibilités aux antibiotiques ont été déterminées par le test de diffusion en gélose (CLSI, 2005), en utilisant des disques commerciaux (Oxoid Ltd., Basingstoke, Royaume-Uni) contenant: 10µg de tétracycline, d'érythromycine et de clindamycine, 25µg de streptomycine et 30µg de gentamicine. Les diamètres des halos d'inhibition ont été mesurés en mm.

## 4. Résultats et Discussion

Les auteurs ont présenté leurs résultats d'une manière structurée et détaillée, sous forme de tableaux et de figures; ils se sont beaucoup plus focalisé sur l'interprétation des résultats surtout ceux concernant la formulation des milieux de culture et la mise au point du nouveau milieu.

### 4.1. Diversité de la souche

Le typage par PFGE a été effectué pour les 52 isolats obtenus à partir de la collection U.C.S.C. L'interprétation des différents profils PFGE a permis la distinction de 42 génotypes différents (données non présentées). Un représentant par type de PFGE a été sélectionné pour des travaux supplémentaires conduisant à une réduction de 74 à 64 souches.

### 4.2 Milieux de culture pour les tests de susceptibilité

Les milieux Iso-Sensitest, Mueller-Hinton, M17, MRS et les milieux supplémentaires obtenus par la combinaison des 4 milieux mentionnés ci-dessus ont été évalués pour leur adéquation pour déterminer les CIMs des 6 antibiotiques pour *S. thermophilus*. La meilleure croissance de *S. thermophilus* a été obtenue avec le M17 bouillon ou agar. Cependant, les auteurs posent le souci quant à l'effet inhibiteur possible du glycérophosphate de sodium présent dans ce milieu sur les aminosides (Sinha, 1984). De plus, M17 n'est pas un milieu standardisé car il contient de l'extrait de levure et peptone, et une variation lot à lot est ainsi possible. Par ailleurs, le milieu Mueller-Hinton sans aucune addition, ou supplémenté avec du lactose, un certain nombre de souches, parmi celles testées, n'ont montré qu'une croissance faible, voire aucune. Pour le milieu Iso-Sensitest additionné de 1% (P/V) de lactose a permis une

croissance satisfaisante de toutes les souches de *S. thermophilus* testées. Pour la tétracycline, cependant, les souches avaient tendance à présenter des halos d'inhibition diffuse sur ce milieu dans le E-test et la méthode de diffusion sur gélose, ce qui entraînait des difficultés à lire la CIM. Le même problème a été observé lors de l'utilisation de LSM (Iso-Sensitest 90% V/V plus MRS 10% V/V) en présence du lactose. Donc, les auteurs ont affirmé que la formulation d'Iso-Sensitest (90% V/V) et M17 (10% V/V) additionné de lactose (0,5% P/V), dénommée le milieu de test de sensibilité de *S. thermophilus* (SSM) a fourni la base de milieu la plus optimale en termes de croissance et de lecture claire de CMI pour le E-test, la diffusion sur disque et la micro-dilution. Selon l'avis des auteurs, le nouveau milieu SSM permet une meilleure croissance de *S. thermophilus* et génère des distributions de CMI plus reproductibles et plus étroites. L'identification des souches résistantes aux antibiotiques était donc simple et indépendante de la méthode de test de sensibilité utilisée. Pour cette raison, ils recommandent la formulation SSM pour les tests de sensibilité aux antibiotiques de *S. thermophilus*.

#### 4.3 Tests de susceptibilité

Les CIMs de l'érythromycine, la clindamycine, la streptomycine, la gentamicine, la tétracycline et l'ampicilline ont été déterminées pour les 64 souches de *S. thermophilus* par la méthode de micro-dilution, le E-test et la diffusion par disque. L'ensemble des résultats obtenus par les trois méthodes de susceptibilité aux antibiotiques sont montrés dans le **tableau II**. En utilisant la méthode de micro-dilution, la plupart des souches de *S. thermophilus* ont affiché des CIMs comprises entre 0.25 et 1 µg/ml et 0.125 et 1 µg/ml respectivement pour l'érythromycine et la tétracycline. Quatre souches ont été capables de croître à 256 µg/ml d'érythromycine. Ces souches ont également présenté une résistance atypique à la tétracycline avec des CIMs allant de 16 à 32 µg/ml. Quatre autres souches étaient résistantes au même taux de tétracycline, mais étaient sensibles à l'érythromycine. Les CIMs de la streptomycine étaient comprises entre 4 et 32 µg/ml avec une souche étant résistante à 128 µg/ml. L'une des souches résistantes à l'érythromycine était également résistante à la clindamycine (CMI > 256 µg/ml). Toutes les autres souches examinées ont montré des CIMs de clindamycine comprises entre 0,03 et 0,125 µg/ml. Aucune souche résistante à la gentamicine ou à l'ampicilline n'a été observée, car les CIMs variaient respectivement de 2 à 16 µg/ml et de 0,03 à 0,5 µg/ml, pour la gentamicine et l'ampicilline.

**Tableau II** : Distribution des CMI pour l'espèce *S. thermophilus* (64 souches) par les méthodes de micro-dilution, E-test et la diffusion en gélose par la méthode de disques.

Antibiotique	Nombre d'isolats pour lesquels la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) est fournie par la méthode de micro-dilution:													
	<0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>256
Erythromycine			14	43	3									4
Streptomycine								4	21	24	14		1	
Tétracycline			3	10	27	17				3	4			
Clindamycine	24	31	8											1
Gentamicine							30	26	6	2				
Ampicilline	16	13	19	13	3									
Antibiotique	Nombre d'isolats pour lesquels la CMI est fournie par la méthode du E-test:													
	<0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>256
Erythromycine		2	32	26										4
Streptomycine								13	24	22	4		1	
Tétracycline			21	36						4	3			
Clindamycine	5	11												1
Gentamicine							27	37						
Ampicilline	22	15	19	8										
Antibiotique	Nombre d'isolats pour lesquels le halo d'inhibition (en mm) est fourni par la méthode de disques:													
	41-47	36-41	30-35	24-29	18-23	12-17	6-11	5*						
Erythromycine		10	42	8				4						
Streptomycine				32	31			1						
Tétracycline		11	37	9			7							
Clindamycine	16	27	20					1						
Gentamicine				28	36									
Ampicilline		38	26											

\* : le diamètre du disque (pas d'halo d'inhibition)

Le tableau III montre le pourcentage de concordance entre les valeurs de CMI fournies par la micro-dilution et le E-test. L'étude a montré une concordance globale > 80% entre les CMI avec  $\pm 1 \log_2$  de la dilution pour la streptomycine, l'érythromycine, la gentamicine et l'ampicilline. Les écarts étaient maximaux avec une dilution au demi par rapport à la méthode de référence de micro-dilution en bouillon. La concordance observée entre les deux méthodes en testant la tétracycline était faible (seulement 30% avec  $\pm 1 \log_2$  de la dilution). Pour cet antibiotique, le E-test a fourni des CMI de deux ou trois dilutions inférieures à la méthode de micro-dilution. Cependant, la gamme des CMI était étroite et reproductible pour les deux méthodes et il a été suggéré donc des seuils microbiologiques différents en fonction de la méthode utilisée. Les auteurs ont trouvé que la micro-dilution fournit une méthode simple et fiable pour déterminer les CMI pour un grand nombre

d'isolats de *S. thermophilus* et ne nécessite pas un œil qualifié pour établir les CMI. Le E-test fonctionne aussi bien que la procédure de micro-dilution en bouillon. La simplicité technique, la commodité et la large gamme de dilution du E-test en font une alternative fiable à la micro-dilution. Pour certaines souches, en testant la tétracycline, la zone d'inhibition était diffuse et la CMI n'était pas facile à lire. Bien que la diffusion sur disque ne donne pas des CMI, cette technique est capable de distinguer les isolats résistants. Les disques sont bon marché et faciles à appliquer et il est possible de tester différents antibiotiques dans la même boîte d'agar.

Les valeurs seuils épidémiologiques sont suggérées dans le tableau IV en fonction des résultats des tests de sensibilité. Les valeurs seuils épidémiologiques de cet article ont été définies comme décrit par EUCAST ([www.escmid.org](http://www.escmid.org)).

**Tableau III :** Concordance de CMI (limites d'agrément) comparant la méthode de référence de micro-dilution en bouillon et le E-test pour les 64 souches de *S. thermophilus*.

L'antibiotique	Ecart $\log_2$ des CMI du E-test par rapport aux CMI de micro-dilution							concordance %	
	< -2	-2	-1	identique	+1	+2	> +2	$\pm 1$	$\pm 2$
Erythromycine	0	2	27	35	0	0	0	97	100
Streptomycine	0	12	28	24	0	0	0	81	100
Tétracycline	17	28	15	4	0	0	0	30	74
Clindamycine	2	15	16	29	0	0	0	69	94
Gentamicine	0	8	11	45	0	0	0	88	100
Ampicilline	0	8	20	33	3	0	0	88	100

**Tableau IV :** Seuils microbiologiques proposés pour les souches de *S. thermophilus*.

L'antibiotique	Micro-dilution ( $\mu\text{g/ml}$ )	E-test ( $\mu\text{g/ml}$ )	Diffusion en gélose ( $\mu\text{g/ml}$ )
Erythromycine	1	1	23
Streptomycine	64	64	17
Tétracycline	2	0.5	23
Clindamycine	0.25	0.25	29
Gentamicine	32	32	17
Ampicilline	1	1	29

#### 4.4 Parenté génétique entre les souches résistantes aux antibiotiques

Les souches de *S. thermophilus* présentant des profils de résistance aux antibiotiques atypiques sont résumées dans le tableau V. Dans la figure 1, les profils PFGE des isolats résistants à l'érythromycine et à la tétracycline suggèrent que 3 des 4 souches (c'est-à-dire E13, E14, E18) sont génétiquement liées comme leurs profils PFGE se différencient uniquement par un seul fragment de restriction.

La souche E2 également résistante à la clindamycine présente un profil différent. Deux des souches (T1 et T3) résistantes à la tétracycline et sensibles à l'érythromycine affichaient des profils très similaires. La souche S1, qui était également résistante à la streptomycine, et la souche T2 montrent des profils uniques. Cela pourrait suggérer à la fois une propagation de la résistance due au transfert horizontal et une dissémination clonale de ces gènes. Pour discuter cette tranche des résultats, les auteurs ont cité en premier les travaux de **Wang et al. (2005)** qui ont identifié des isolats de *S. thermophilus* des gènes de résistance à la tétracycline et à l'érythromycine. Ensuite ceux de (**Leblond et Decaris 1998; Bourgoïn et al., 1999; Bolotin et al., 2004; Pavlovic et al., 2004; Klare et al., 2005**) portant sur des analyses génomiques comparatives de gènes identifiés chez *S. thermophilus* et suggérant que plusieurs déterminants génétiques ont pu être introduits dans le génome de *S. thermophilus* ou acquis sur des plasmides par des événements de transfert horizontal de gènes. Par ailleurs, les huit souches de *S. thermophilus* résistantes aux antibiotiques identifiées dans cette étude (tableau V) ont été isolées utilisant des géloses sélectives aux antibiotiques. Aucun phénotype résistant n'a été observé parmi les autres souches étudiées. Par conséquent, la présence de souches résistantes aux antibiotiques dans cette étude peut être considérée comme faible. Ces souches ont acquis des gènes de résistance sur la base de leur résistance à l'érythromycine, à la tétracycline et à la streptomycine (tableau V).

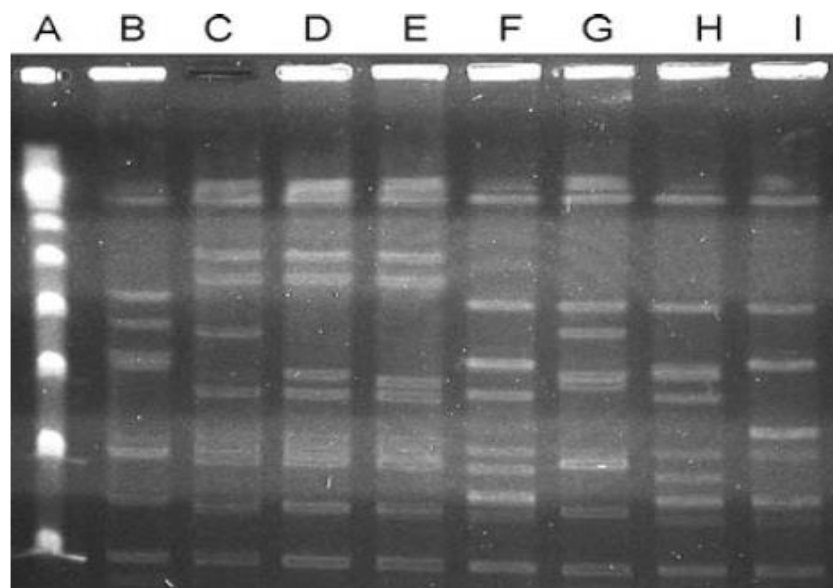
Ces 8 souches sur les 64 souches au total devraient faire l'objet d'analyses génétiques plus approfondies, en particulier l'identification et la localisation de gènes résistants aux antibiotiques et des expériences de conjugaison, afin de déterminer si elles ont des gènes de résistance transférables. La présence de gènes de résistance aux antibiotiques sur les éléments mobiles présente le risque le plus élevé de dissémination de la résistance. La sélection des microorganismes à utiliser comme additif alimentaire doit être orientée vers l'organisme le moins résistant dans la mesure du possible (**FEEDAP Panel, 2005**).



**Tableau V :** Souches atypiques de *S. thermophilus* résistantes aux antibiotiques.

Souche	Origine et année d'isolement	Phénotype de résistance (R, S)*			
		Tétracycline	Erythromycine	Streptomycine	Clindamycine
E2	Lait cru d'Italie 2004	R	R	S	R
E13		R	R	S	S
E14		R	R	S	S
E18		R	R	S	S
T1		R	S	S	S
T2		R	S	S	S
T3		R	S	S	S
S2	Lait cru d'Italie 2005	R	S	R	S

\*R : phénotype résistant, S : phénotype sensible

**Figure I :** Profils de PFGE des fragments de restriction de l'ADN chromosomique des *S. thermophilus* résistants obtenus par digestion avec SmaI.

Les pistes B, C, D, E : souches E2, E13, E14, E18 résistantes à l'érythromycine et à la tétracycline.

Les pistes F, G, H : souches T1, T2, T3 résistantes à la tétracycline.

La piste I : souche S1 résistante à la streptomycine et la tétracycline.

La piste A : le marqueur de poids moléculaire lambda 50 kb.

## 5. Conclusion

Dans la conclusion de cette publication les auteurs sont revenus en premier lieu sur l'exploit le plus remarquable qui concerne le développement d'un nouveau milieu pour tester la sensibilité de *S. thermophilus* aux antibiotiques, ce qui a permis une identification facile des souches présentant une résistance atypique aux antibiotiques. Les auteurs ont rappelé brièvement des principaux résultats obtenus avec 64 souches différentes de *S. thermophilus*. Pour six antibiotiques, ils ont pu définir les niveaux normaux de sensibilité et ont ainsi été capables d'identifier les souches sans résistance indésirable. Huit souches se sont révélées présenter une résistance phénotypique atypique à un ou plusieurs de ces antibiotiques et doivent être soumises à une caractérisation plus poussée pour évaluer la base génétique de la résistance.

## 6. Références Bibliographiques

Les auteurs ont utilisé des références bien adaptées au thème, surtout en ce qui concerne la partie expérimentale.

**Article 2:** Antibiotic Resistance-Susceptibility Profiles of *Streptococcus thermophilus* Isolated from Raw Milk and Genome Analysis of the Genetic Basis of Acquired Resistances. Florez A.B., & Mayo B., 2017. *Frontiers in Microbiology*. **8** : 1-12.

**Article disponible sur:**

**[https://digital.csic.es/bitstream/10261/182917/1/Antibiotic%20Resistance-Susceptibility\\_Florez.pdf](https://digital.csic.es/bitstream/10261/182917/1/Antibiotic%20Resistance-Susceptibility_Florez.pdf)**

### **Description de l'étude**

- Ce travail de recherche qui porte sur l'étude des profils de résistance et de sensibilité de *Streptococcus thermophilus* isolés à partir de lait cru et de l'analyse génomique des gènes de résistance acquise a été réalisé par Florez et son collaborateur de département de microbiologie et biochimie de l'institut des produits laitiers d'Asturias en Espagne. Elle a été publiée en 2017 dans le journal *Frontiers in Microbiology*.

### **Justification du choix de l'article**

- Cet article a été choisi pour être présenté car il complète la thématique du premier article (**Tosi et al., 2007**), ils se rapprochent approximativement au niveau de la problématique posée qui touche à la résistance de *S. thermophilus* aux antibiotiques.

### **1. Résumé**

Vu l'importance du thème, les auteurs ont abordé le résumé par le rôle la chaîne de production alimentaire dans la transmission des résistances aux antibiotiques des bactéries commensales et bénéfiques aux pathogènes. Ils ont donné par la suite un aperçu général des travaux réalisés et qui concernent la détermination de concentration minimale inhibitrice (CIM) de 16 agents antimicrobiens vis-à-vis de 41 isolats de *S. thermophilus* dérivés du lait cru. Leurs résultats ont montré des souches résistantes à la tétracycline (sept), à l'érythromycine et à la clindamycine (deux), ainsi qu'à la streptomycine et à la néomycine (une). Une amplification par la PCR, a pu identifier le gène *tet(S)* dans toutes les souches résistantes à la tétracycline et le gène *ermB* dans deux souches résistantes à l'érythromycine/clindamycine. Des expériences d'hybridation ont suggéré que chaque gène de résistance soit localisé dans le chromosome avec une organisation génétique similaire. Par ailleurs, un séquençage et une analyse du génome ont été effectués sur les quelques souches trouvées résistantes aux antibiotiques suivants: tétracycline (St-2 et St-9),

érythromycine/clindamycine (St-5 and St-6), et streptomycine/néomycine (St-10). La capacité de transfert des gènes *tet (S)* ou de *ermB* de *S. thermophilus* vers *L. delbrueckii* sous les conditions de fabrication et de stockage du yaourt a été aussi investiguée. Les auteurs ont indiqué que les résultats de cette étude d'aspect moléculaire contribuent à la caractérisation des profils de résistance aux antibiotiques chez *S. thermophilus*, fournissant ainsi des preuves de la base génétique des résistances acquises et approfondissent sur leur capacité de transfert.

## 2. Introduction et objectifs

Dans cette première étape de l'introduction, les auteurs et se référant à de multiples travaux (**Wang et al., 2012; Marshall & Levy, 2011; Watkins & Bonomo, 2016**) ont souligné que la résistance aux antimicrobiens (surtout les antibiotiques) utilisés en médecine humaine et vétérinaire est un problème global et que la détection dans différents aliments de bactéries antibio-résistantes a suscité des inquiétudes concernant l'impact des bactéries alimentaires en tant que réservoirs de gènes de résistance; et comment elles peuvent être impliquées dans la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques. A propos de la résistance, différents auteurs (**Ammor et al., 2007; Devirgiliis et al., 2013; Soares-Santos et al., 2015**) ont caractérisé les déterminants de la résistance aux antibiotiques dans les bactéries associées aux produits laitiers et directement à partir de l'ADN total des produits laitiers (**Devirgiliis et al., 2008; Flórez et al., 2014**). Les gènes de résistance ont tendance à s'installer sur des éléments génétiques mobiles à grande capacité de transfert (**BrownJaque et al., 2015**). Sans surprise, les déterminants de la résistance identifiés dans les bactéries environnementales ont été reconnus comme identiques à ceux trouvés dans des pathogènes (**Davies & Davies, 2010; Forsberg et al., 2012**). Les interactions microbiennes complexes qui peuvent avoir lieu durant la fabrication des produits laitiers fermentés (**Irlinger et Mounier, 2009**) et le contact des microorganismes du lait après ingestion avec les populations microbiennes de l'intestin (**Qin et al., 2012**) fournissent en effet des scénarios idéaux dans lesquels les événements de transfert horizontal de gènes peuvent se produire. Dans la seconde étape, les auteurs ont introduit l'espèce *Streptococcus thermophilus* en tant qu'une bactérie lactique dominant la fabrication et l'affinage de nombreux produits laitiers notamment le yaourt et certains types de fromages italiens et suisses (parmesan, grana, emmental, gruyère, etc.). *S. thermophilus* convertit rapidement le lactose en acide lactique

et comme les autres espèces de bactéries lactiques métabolise les protéines du lait, donnant naissance à des composés aromatiques clés. Cette propriété a élargi l'utilisation de cet organisme comme culture d'appoint pour les fromages fabriqués en utilisant des starters mésophiles (comme le Cheddar, le Gouda, le Manchego, etc.) (Cui *et al.*, 2016). L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) inclut *S. thermophilus* dans sa liste de micro-organismes bénéficiant du statut de présomption d'innocuité reconnue (QPS) (EFSA, 2017). La qualification des souches de *S. thermophilus* comme starters ne nécessite donc que la confirmation de l'absence de résistances antimicrobiennes transmissibles (Delorme, 2008; EFSA, 2017). Cependant, les auteurs ont indiqué qu'un certain nombre de souches de *S. thermophilus* résistantes aux antibiotiques ont déjà été détectées et leurs déterminants de résistance caractérisés (Tosi *et al.*, 2007; Rizzotti *et al.*, 2009; Arioli *et al.*, 2014). C'est dans cette optique les objectifs de ce travail étaient: (i) de déterminer les profils de résistance/sensibilité aux antibiotiques d'un ensemble d'isolats de *S. thermophilus* dérivés du lait cru; (ii) étudier la base génétique des résistances rencontrées par PCR conventionnelle et analyse de séquençage du génome entier; et (iii) examiner la capacité de certains gènes de résistance aux antibiotiques à se transférer horizontalement de *S. thermophilus* à *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* lors de la fabrication et du stockage du yaourt

### 3. Matériels et méthodes

Cette section est dominée par des techniques de biologie moléculaire très importante, ce qui a permis de donner à l'étude un aspect de microbiologie moléculaire.

#### 3.1 Souches bactériennes et conditions de croissance

Ce travail a concerné quarante et un (41) isolats sauvages de *S. thermophilus* sélectionnés parmi une collection de 106 précédemment obtenus à partir d'échantillons de lait cru, par une procédure sélective selon Delgado *et al.*, (2013). D'autres souches de références appartenant aux espèces *S. thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. plantarum* et *Enterococcus faecalis* ont aussi été utilisées et dont les informations relatives sont citées dans la publication (voir le lien). Les souches de *S. thermophilus* ont été cultivées statiquement dans des conditions d'anaérobiose sur milieu M17 (Oxoid, Basingstoke, Royaume-Uni) avec 0,5% de lactose (LM17) ou Mueller-Hinton (Oxoid) à 37°C pendant 24 à 48h.

### 3.2 Concentration minimale inhibitrice des antibiotiques

Les CMI de 16 antibiotiques représentatifs ont été déterminées selon la norme ISO 10932: 2010 (FIL, 2010), en utilisant des boîtes VetMIC pour les bactéries lactiques (National Veterinary Institute, Uppsala, Suède). En bref et pour la préparation de l'inoculum, des colonies individuelles cultivées sur de boîtes de gélose Mueller-Hinton ont été mises en suspension dans 2 mL de solution saline stérile (Oxoid), pour obtenir une densité correspondante au standard McFarland 1 ( $\approx 3 \times 10^8$  UFC/ mL). Cette suspension a été encore diluée au 1:1000 dans du bouillon Mueller-Hinton jusqu'à une concentration finale d'environ  $3 \times 10^5$  UFC/ ml. Cent microlitre de cet inoculum ont ensuite été ajoutés à chaque puits de la plaque VetMIC. Les plaques VetMIC contenaient une série de dilutions au  $\frac{1}{2}$  des antibiotiques : ampicilline, ciprofloxacine, clindamycine, chloramphénicol, érythromycine, gentamicine, kanamycine, linézolide, néomycine, pénicilline, rifampicine, tréptomycine, tétracycline, triméthoprime, vancomycine et virginiamycine. Les CMI ont été lues visuellement après 48h d'incubation à 37°C. Pour certains antibiotiques, la gamme de concentration des plaques VetMIC s'est avérée insuffisante; leurs CMI ont été déterminées à l'aide du système MICE (Oxoid), conformément aux recommandations du fabricant.

Un isolat était considéré comme phénotypiquement résistant à un antibiotique lorsqu'il n'a pas été inhibé à une concentration égale ou supérieure au seuil écologique établi (ECOFF) tel que défini par l'EFSA (EFSA, 2012).

### 3.3. Extraction de l'ADN et recherche par PCR des gènes de résistance aux antibiotiques

L'ADN génomique total a été extrait des isolats de *S. thermophilus* en utilisant un kit GenElute (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA), pour la purification de l'ADN génomique bactérien, selon les instructions du fabricant. Par ailleurs, la présence de gènes de résistance à la tétracycline dans des isolats résistants a été étudiée par PCR, en utilisant les amorces universelles pour les gènes codant pour les protéines de protection ribosomale DI-DII (Clermont *et al.*, 1997) et Tet1-Tet2 (Barbosa *et al.*, 1999), et des amorces spécifiques pour tet (W) (Scott *et al.*, 2000) tet (M), tet (S), tet (O), tet (K) et tet (L) (Gevers *et al.*, 2003). Les conditions de PCR étaient celles décrites dans la littérature citée. Les gènes associés à la résistance à l'érythromycine (ermA, ermB, ermC, msrA, ermF et mefA) ont été recherchés par PCR en utilisant les amorces et les conditions rapportées par Hummel *et al.* (2007) et Rizzotti *et al.* (2009). Les amplicons ont ensuite été soumis à une électrophorèse, visualisés

par coloration avec du bromure d'éthidium ( $0,5 \text{ ug mL}^{-1}$ ) et photographiés. Les amplicons sélectionnés ont été purifiés à l'aide du kit GenElute PCR Clean-up (Sigma-Aldrich), séquencés dans un séquenceur d'ADN ABI 373 (Applied Biosystems, Waltham, Ma., USA), et les séquences obtenues ont été comparées par rapport à celles de la base de données NCBI en utilisant Blast logiciel (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### 3.3 Typage des isolats par PCR

Les isolats ont été typés selon leur profil d'empreinte RAPD et rep-PCR en utilisant l'amorce M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') comme reporté par **Rossetti et Giraffa (2005)**. L'amorce BoxA2R (5'-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3') comme reporté par **Koeuth et al. (1995)** et l'amorce OPA18 (5'-AGGTGACCGT-3') comme reporté par **Matto et al. (2004)**. Les amplifications de RAPD et rep-PCR ont été effectuées indépendamment dans des volumes de 25  $\mu\text{L}$  contenant 12.5  $\mu\text{L}$  de MasterMix (Ampliqon, Odense, Denmark), 5  $\mu\text{L}$  de chaque amorce (10  $\mu\text{M}$ ), 3  $\mu\text{L}$  de l'ADN purifié et l'eau de qualité biologie moléculaire (Sigma-Aldrich). L'amplification de l'ADN implique 1 cycle de 95°C pour 7min, suivi par 40 cycles de dénaturation (à 90°C durant 30sec), ensuite l'hybridation (à 42°C [M13], 40°C [BoxA2R] ou 32°C [OPA18] pour une minute) et l'élongation à 72°C durant 4min. L'étape finale de l'élongation a été effectuée à 72°C durant 10 min. Les produits de réaction de typage ont été exposés à l'électrophorèse et enregistrés comme ci-dessus. Le logiciel GeneTools v.4.03 (SynGene, Cambridge, Royaume-Uni) a été utilisé pour comparer les profils. Les modèles ont été regroupés en utilisant le groupe de paires non pondérées avec la méthode de la moyenne arithmétique (UPGMA) et la similitude des modèles a été exprimée via le coefficient d'appariement simple (SM).

### 3.4 Hybridation de l'ADN

Dans cette technique, l'ADN total des souches résistantes à l'érythromycine et à la tétracycline a été digéré avec les enzymes de restriction HindIII ou PstI (EURx, Gdansk, Pologne). Après électrophorèse, l'ADN a été transféré sur des membranes en nylon Hybond-N (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), en utilisant un protocole standard de **Sambrook et Russell, (2001)**. Ensuite, des segments internes des gènes *ermB* et *tet (S)*, tous deux amplifiés par PCR, ont été utilisés indépendamment comme sondes après marquage à la

digoxigénine, en utilisant le kit II non radioactif DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter (Roche, Bâle, Suisse).

Le marquage, l'hybridation sous des conditions de stringence élevée, et la détection ont été effectués, suivant les recommandations du fabricant. Les signaux d'hybridation ont été détectés par chimioluminescence en utilisant un système d'imagerie numérique ImageQuant 350 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA).

### 3.5 Séquençage et annotation du génome

La construction de la banque génomique de 0.5 kb à partir de l'ADN total appartenant aux 5 souches de *S. thermophilus* résistantes aux antibiotiques, les paires sont séquencées par le séquenceur HiSeq 1000 System à l'institut de Beijing Genomics (BGI, Shenzhen, China). Les génomes ont été annotés en utilisant le système d'annotation RAST et le réseau d'annotation du génome des procaryotes de NCBI.

#### Genome Sequencing and Annotation

A genomic library of 0.5 kbp was constructed from total DNA belonging to five antibiotic resistant *S. thermophilus* strains, and paired-end sequenced using a HiSeq 1000 System sequencer at the Beijing Genomics Institute (BGI, Shenzhen, China). Quality-filtered reads were assembled in contigs using Spades software v.3.6.2. (<http://cab.spbu.ru/software/spades/>) (Bankevich *et al.*, 2012). Genomes were annotated using the RAST annotation system (<http://rast.nmpdr.org/>) and the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)). DNA and deduced protein sequences of interest were examined for homology using the on-line Blast program as above. The homology of DNA and proteins was further investigated by searching databases such as CARD (<http://arpcard.mcmaster.ca/>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), Uniprot (<http://www.uniprot.org>) and COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>).

### 3.6 Analyse phylogénétique de génome de base et de pangénome

Une analyse comparative du génome de 5 souches de *S. thermophilus* séquencées dans cette étude et 32 séquences ont été performées du génome disponibles ouvertement sur la base de données de NCBI. Le pan-génome de *S. thermophilus* a été déduit par le logiciel Roary version 3.7.0 (Page *et al.*, 2015).



### 3.7 Analyse du transfert durant la fermentation du lait

Des essais d'accouplement ont été réalisés pour tester la transférabilité des gènes ermB et tet (S) de *S. thermophilus* à deux souches de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* lors de la fabrication et du stockage de laits fermentés de type yaourt. Le donneur et le receveur ont été cultivés indépendamment pendant une nuit dans du lait UHT (CAPSA, Siero, Espagne). Ces cultures ont été utilisées pour inoculer du lait UHT frais (2% pour chaque donneur et receveur). Le lait inoculé a été incubé pendant une nuit à 42°C et les produits fermentés ont été stockés à 4°C pendant 15 jours maximum. Le donneur et le receveur ont été comptés respectivement les milieux LM17 et MRS. Les transconjugants de *Lactobacillus* ont été sélectionnés sur gélose MRS (Oxoid) supplémentée avec des antibiotiques appropriés (20µg mL<sup>-1</sup> tétracycline et 5µg mL<sup>-1</sup> érythromycine selon les besoins). Les expériences ont été répétées deux fois.

### 3.8 Numéros d'accès "Genbank"

Les auteurs ont mentionné que les séquences génomiques de *S. thermophilus* St-2, St-5, St-6, St9 et St-10 ont été déposées au niveau de la base de données GenBank sous le BioProject PRJNA419299, avec les numéros d'accession SAMN08049010 à SAMN0804914, respectivement.

## 4. Résultats

Dans cet article la section des résultats est séparée de la discussion. Notons que les résultats sont très bien détaillés et argumentés et riches en termes clés de biologie moléculaire, ils ont été présentés tel qu'ils ont été publiés par les auteurs. Par ailleurs et pour une meilleure présentation de cette section, des titres ont été proposés à chaque tranche de résultats.

**Remarque:** Les figures et les tableaux supplémentaires sont disponibles sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02608/full#supplementary-material>

### 4.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les CMI de 16 antibiotiques testés sur les souches de *S. thermophilus* étudiées sont montrées dans le **tableau I**. L'analyse de ces CMI et la comparaison avec des données de la littérature indiquent que sept isolats étaient résistants à la tétracycline (CMI ≥ 8µg mL<sup>-1</sup>), deux résistants à l'érythromycine et la clindamycine (CMI ≥ 128 et ≥16 µg mL<sup>-1</sup> respectivement), et un résistants à la streptomycine (CMI ≥ 128 µg mL<sup>-1</sup>). Bien que la valeur

seuil de la néomycine à *S. thermophilus* n'est pas été encore établie (EFSA, 2012), la CMI de cet antibiotique pour des isolats résistants à la streptomycine était beaucoup plus élevée que celles enregistrées pour tous les autres isolats (256 comparés à 2-32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Cela a suggéré que cette souche était résistante à la fois à la streptomycine et à la néomycine. L'analyse de la distribution des CMIs, qui suit la normalité statistique dans le cas de la résistance intrinsèque (Murray *et al.*, 2003), a conduit aux mêmes conclusions concernant le nombre et les types d'isolats résistants - à l'exception d'un isolat, pour lequel la CMI de la tétracycline n'était supérieure que d'une dilution de la valeur seuil (8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  par rapport à 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (tableau I).

**Tableau I:** Distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMIs) déterminées par la méthode de micro-dilution en bouillon de 16 antibiotiques pour 41 souches de *S. thermophilus* isolées du lait cru.

Antibiotique	Seuils de l'EFSA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Nombre de souches avec les CMIs ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )												
		≤0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Gentamicine	32					10	21	8	2					
Kanamycine	64								2	12	18	9		
Streptomycine	64							3	20	13	4		1 <sup>a</sup>	
Néomycine	-						6	18	9	4	3			1 <sup>a</sup>
Tétracycline	4			3	8	17	5	1	1		3	3		
Erythromycine	2	23	10	6									2 <sup>b,c</sup>	
Clindamycine	2	35	10		1					2 <sup>c,d</sup>				
Chloramphénicol	4					1	29	11						
Ampicilline	2	10	17	9		3	2							
Pénicilline G	-	13	15	5	4	2	1	1						
Vancomycine	4			3	34	2	1	1						
Virginiamycine	-		10	23	8									
Linézolide	-				2	34	5							
Triméthoprim	-									1	12	13	15 <sup>d</sup>	
Ciprofloxacine	-			1		5	17	14	4					
Rifampicine	-	7	5	18	9	2								

Les cases grisées montrent les souches considérées comme résistantes dans ce travail.

<sup>a</sup> : La souche avec la CMI la plus élevée à la fois pour la streptomycine et la néomycine était la même.

<sup>b</sup> : Ces deux souches ont pu croître à la concentration d'érythromycine la plus élevée testée dans le test de micro-dilution en utilisant les plaques VetMIC (8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); la valeur actuelle de la CMI a été obtenue dans un test E-test ultérieur, testant une plus large gamme de concentrations d'antibiotiques.

<sup>c</sup> : Les deux souches résistantes à l'érythromycine et à la clindamycine étaient les mêmes.

<sup>d</sup> : la concentration la plus élevée testée pour la clindamycine et le triméthoprim par la méthode de micro-dilution était 8 et 64  $\mu\text{g/ml}$  respectivement; les CMIs de ces deux antibiotiques doivent être lues respectivement comme  $\geq 16$  et  $\geq 128$   $\mu\text{g/ml}$ .

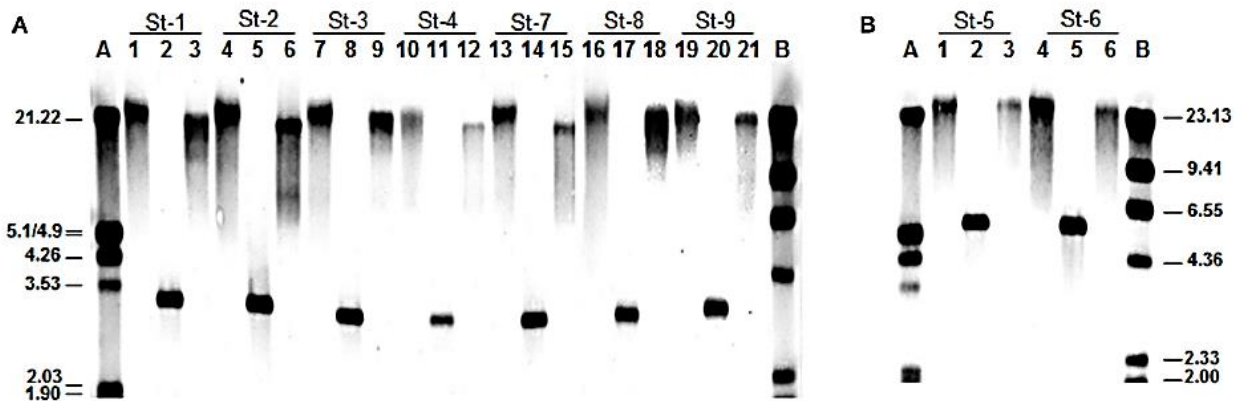
#### 4.2. Détection par PCR des gènes d'antibio-résistance

Les auteurs rappellent ici que la détection de ou des déterminants génétiques responsables de la résistance à la tétracycline et à l'érythromycine et la présence de gènes bien connus associés à la résistance à ces antibiotiques ont été étudiées par PCR à l'aide d'amorces universelles et spécifiques du gène. Avec les paires d'amorces universelles DI-DII ou Tet1-Tet2, tous les isolats résistants à la tétracycline ont donné des amplifications positives. Une analyse plus approfondie a montré qu'ils produisaient tous un amplicon, lors de l'utilisation d'amorces ciblant spécifiquement le gène tet(S). Les amplicons séquencés étaient identiques aux nucléotides entre eux et à certaines séquences de gènes tet (S) de différentes espèces, conservées dans une base de données. De même, les deux isolats résistants à l'érythromycine ont produit des amplicons avec des séquences nucléotidiques identiques entre elles et aux séquences du gène ermB dans les bases de données. Puisqu'aucune corrélation entre les gènes et la résistance aux aminosides semble exister dans de nombreuses espèces de bactéries lactiques (**Ammor *et al.*, 2008**), aucun gène associé à ce phénotype n'a été recherché par amplification par PCR.

#### 4.3 Localisation génétique des gènes de résistance par l'hybridation et résultats du typage moléculaire

Les résultats des expériences d'hybridation réalisées en utilisant des segments internes de tet (S) ou ermB comme sonde pour identifier l'emplacement génétique de la résistance des isolats aux antibiotiques sont montrés dans **la figure 1**. La constatation de signaux d'hybridation dans l'ADN total non digéré et digéré (HindIII et PstI) environ aux mêmes positions dans les isolats hébergeant le gène tet (S) (Figure 1A) ou le gène ermB (Figure 1B) suggère l'organisation génétique des gènes dans chacun des isolats résistants être identique ou du moins très similaire. Par ailleurs, aucune bande plasmidique n'a été détectée dans aucun des isolats résistants (données non présentées); les gènes tet (S) et ermB ont donc été considérés comme étant localisés dans le chromosome bactérien. Les isolats résistants à la tétracycline (sept) et à l'érythromycine (deux) ont ensuite été soumis à un typage moléculaire par la technique d'amplification rapide de l'ADN polymorphe (RAPD) à l'aide de trois amorces différentes, afin d'évaluer si elles correspondaient à des souches différentes ou à des répliques (Figure supplémentaire 1A–C). Compte tenu de la reproductibilité du test (>92%; données non présentées), les isolats partageant un pourcentage de similitude >90%

(un chiffre arbitraire) ont été considérés comme étant la même souche. Dans ces conditions expérimentales, six souches différentes ont été envisagées, dont quatre ont montré une résistance à la tétracycline et deux une résistance à l'érythromycine (Figure supplémentaire 1D). En raison de son phénotype distinctif, l'isolat résistant à la streptomycine a été considéré comme une souche indépendante.



**Figure 1 :** Analyse de Southern blot de l'ADN génomique total non digéré et digéré par Hind III et PstI des souches de *S. thermophilus* résistantes à la tétracycline (**A**) et l'érythromycine (**B**), respectivement. En tant que sonde, les segments internes des gènes tet(S) (**dans A**), et erm (**dans B**) obtenus par PCR spécifique et marqués à la digoxygénine (Roche) ont été utilisés. Les marqueurs de poids moléculaires, (**A**): ADN de lambda digéré par EcoRI et Hind III et marqué à la digoxygénine; (**B**): ADN de lambda digéré par Hind III et marqué à la digoxygénine. La taille des fragments (en kb) est indiquée. Les numéros de code des souches résistantes sont donnés au-dessus des pistes.

#### 4 Séquençage du génome et analyses des données phylogénétiques

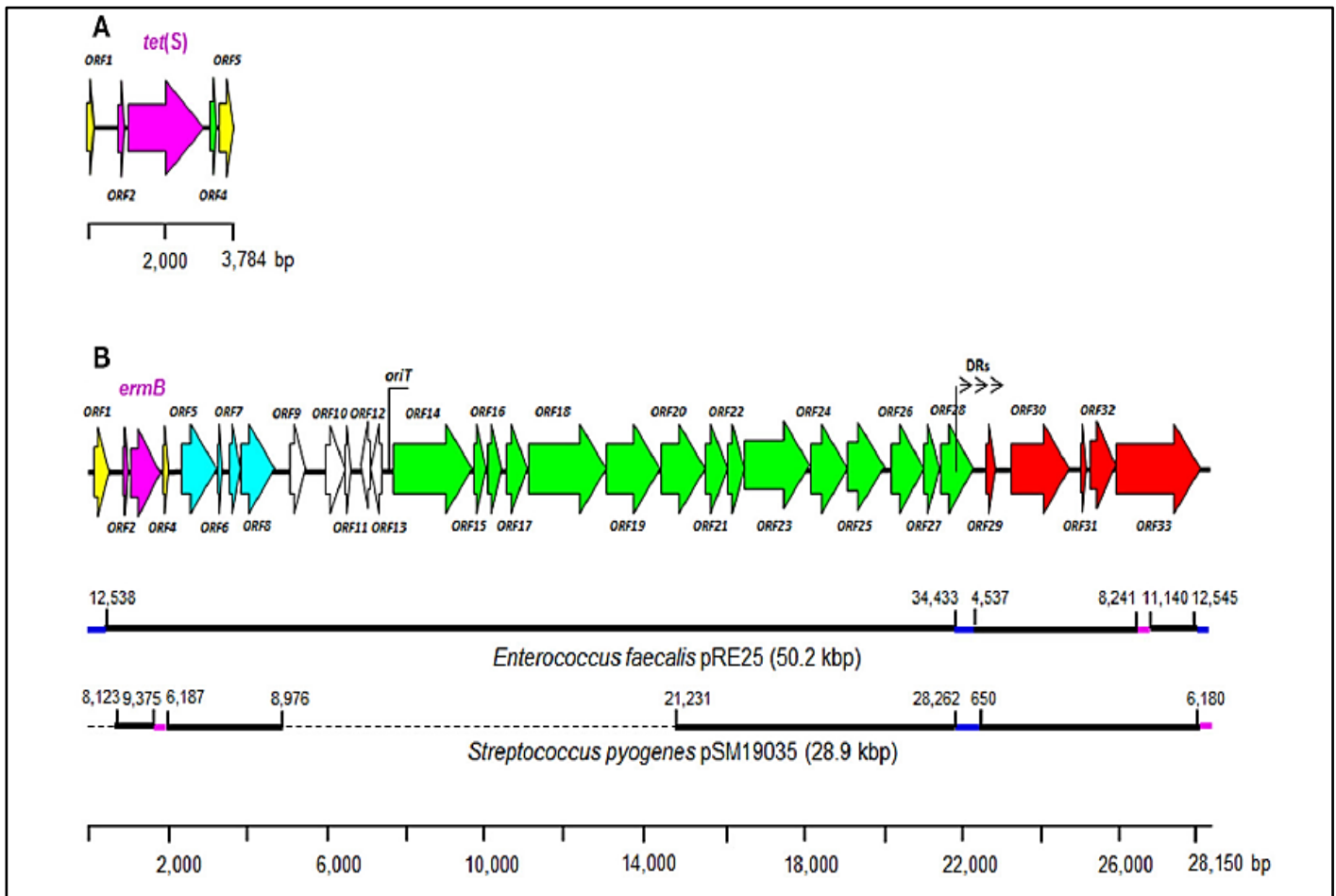
Sur la base des résultats phénotypiques, d'hybridation et de typage, cinq souches (St-2 et St-9 résistantes à la tétracycline, St-5 et St6 résistantes à l'érythromycine/clindamycine et St-10 résistantes à la streptomycine/néomycine) ont été soumises au séquençage du génome. Les données générales des projets de séquençage du génome des cinq souches *S. thermophilus* sont résumées dans le tableau supplémentaire I. En général, des résultats similaires ont été obtenus pour chaque souche. La taille des génomes était, dans tous les cas, d'environ 1,9

Mbp et le nombre de contigs variait entre 56 et 79. Les principales caractéristiques génétiques des génomes découverts lors de l'analyse de séquence sont résumées dans le tableau supplémentaire II. Des gènes uniques (aucune hétérogénéité de séquence) codant pour les trois molécules d'ARNr (23S, 16S et 5S) ont été trouvés dans toutes les souches. Plusieurs groupes de gènes de type bactériocine ont également été identifiés dans toutes les souches, ainsi que certains gènes codant pour des protéines homologues à d'autres considérées comme des toxines (toxine exfoliative, protéine J, doc toxine, etc.) produites par des staphylocoques et des streptocoques pathogènes.

Aussi, une vaste gamme de gènes dédiés au transport et à la dégradation des sucres et des polysaccharides a été enregistrée. Malgré l'origine laitière des isolats, aucun gène codant pour une protéinase caséinolytique similaire à PrtS (**Delorme et al., 2010**) n'a été identifié (Tableau supplémentaire II). Une analyse comparative des séquences génomiques des cinq souches de *S. thermophilus* de cette étude et de 32 souches de GenBank (tableau supplémentaire III) a été entreprise pour fournir des connaissances sur les caractéristiques génotypiques de la souche et leurs relations évolutives. En outre, le pan-génome de toutes les 41 souches présentait un total de 5165 gènes, dont un ensemble de 655 gènes étaient présents dans > 99% des souches (Core-génome). En tant que gènes partagés, un groupe de 1690 gènes a été identifié dans 15 à 95% des souches, et 2820 gènes étaient présents dans moins de 15% des souches. En se concentrant sur les souches résistantes aux antibiotiques, l'analyse Roary a identifié une gamme de gènes uniques (de 18 à 81) parmi les souches de cette étude (tableau supplémentaire II). Sur la base du contenu génétique obtenu avec le Roary, l'analyse phylogénomique de 32 souches représentatives de *S. thermophilus* disponibles dans la base de données NCBI et des cinq souches sauvages résistantes aux antibiotiques de *S. thermophilus* de cette étude, a séparé les souches en trois clades non liés (Figure supplémentaire 2). Les souches de résistance aux antibiotiques ont été attribuées au clade A (une souche) et au clade B (quatre souches). Bien qu'elles puissent toutes être distinguées par certaines caractéristiques génomiques (tableau supplémentaire II), les souches résistantes à la tétracycline et à l'érythromycine se sont avérées être des parents proches, en particulier St-5 et St-6 (les deux souches résistantes à l'érythromycine). Le clade C comprenait la majorité des souches; celles-ci ont pour la plupart été isolés à partir de starters commerciaux et naturels et se sont avérés être phylo-génétiquement distantes des souches sauvages de cette étude.

Par ailleurs et omme il a été prévu, l'analyse du génome a également confirmé la présence de tet (S) et ermB dans les souches résistantes à la tétracycline et à l'érythromycine dans lesquelles ils ont été préalablement détectés par PCR. En plus de ceux-ci, les gènes 20, 14, 14, 18 et 15 dans les souches St-2, St-5, St-6, St-9 et St-10 respectivement, ont été classés par le serveur RAST comme appartenant à la catégorie «Virulence, Maladie et défense », sous-catégorie« Résistance aux antibiotiques et Composés toxiques.». La majorité de ces derniers gènes codent pour des composants dédiés à l'homéostasie et/ou la résistance aux métaux lourds tels que l'arsenic, le cuivre, le mercure et la triade cobalt-zinc-cadmium. En outre, les ORFs codant pour les facteurs d'élongation, pompes d'efflux, ADN gyrases et topoisomérases ont également été inclus par le RAST dans cette sous-catégorie. Ni le contenu du gène (présence de gènes préoccupants [comme indiqué dans les bases de données] dans le génome de la plupart des souches), ni le contexte du gène (flanqué par des gènes constitutifs de ménage [housekeeping like genes] en l'absence de séquences d'ADN liées aux éléments génétiques mobiles dans le voisinage) n'ont suggéré que l'un d'entre eux soit un véritable gène dédié à la résistance aux antibiotiques. Aucun gène connu pour être impliqué dans la résistance aux aminosides chez les bactéries lactiques n'a été identifié dans la souche résistante à la streptomycine/néomycine (St-10).

Le gène tet (S) a été trouvé dans les souches St-2 et St-9 dans deux contigs courts organisés de manière similaire de 3224 et 3784 pb, respectivement. L'organisation génétique du plus grand contig est représentée dans Figure 2A. L'examen des résultats d'hybridation n'a pas donné des indices concernant l'organisation génétique de ces gènes, car le fragment HindIII de  $\approx 3,3$  kpb comprenait une grande partie de tet (S) et s'étendait au-delà de la séquence dans les contigs. Dans les deux cas, il a été démontré que les gènes étaient flanqués de fragments d'éléments de type séquence d'insertion (IS). À partir de la position 98, la séquence du contig le plus court était identique à celle du plus grand, mais plus petite de 246 pb. Néanmoins, dans les deux contigs, le tet (S) était flanqué des deux côtés par des copies tronquées des mêmes éléments dérivés du SI: un fragment d'un élément de type IS256 à l'extrémité 5' et un fragment de type IS6 à l'extrémité 3'. En amont du tet (S), une répétition inversée de 16 pb a été trouvée (Tableau supplémentaire VI) chevauchant une séquence d'ADN codant pour un peptide avec des acides aminés similaires au segment interne du peptide leader tet (M) (**Su et al., 1992**); il a été démontré que ce peptide est impliqué dans l'atténuation transcriptionnelle.



**Figure 2** : Organisation génétique des ORFs dans le contig portant les gènes de résistance à la tétracycline *tet(S)* de la séquence de génome de *S.thermophilus* St-9 (**A**) et dans le contig portant le gène de résistance *erm(B)* du génome de *S.thermophilus* St-5 (**B**). La couleur code des ORFs: jaune, ORFs complets et/ou incomplets, liés aux transposases, invertases et topoisomérases. En pourpre, les ORFs impliqués dans la résistance aux antibiotiques, en bleu clair, Les ORFs relatifs à la ségrégation et stabilité des plasmides. En vert, l'ORF impliqué dans la conjugaison/mobilisation. En blanc, les ORFs codant pour des protéines hypothétiques ou des protéines codant pour d'autres systèmes.

Particularités de (**B**): (i) la position de *oriT* est aussi indiquée, (ii) les pointes de flèche représentent une région de répétitions directes (DR) devant le module de réplication, qui n'a montré aucune homologie significative avec celles de pRE25 et pSM19035, (iii) longs segments du contig (barres noires) très similaires (>99% d'identité nucléotidique) ou identiques aux séquences plasmidiques de pRE25 d'*Enterococcus faecalis* et de pSM19035 de *Streptococcus pyogenes*, comme indiqué; (iv) la numérotation dans les plasmides indique les positions de début et de fin des régions d'homologie avec les séquences du contig, (v) barres pourpres, constituées d'éléments de séquence d'insertion tronquée (IS), régions d'homologie non colinéaires séparées; (vi) les barres bleues indiquent les régions de faible homologie avec celles trouvées dans pRE25 et pSM19035; (vii) la ligne pointillée indique des séquences qui ne sont pas présentes dans le pSM19035.

Comme il a été observé pour tet (S), les gènes ermB dans St-5 et St6 ont été identifiés dans des contigs de 28150 et 1615pb respectivement. A l'exception du dernier nucléotide à l'extrémité 3', la séquence entière du contig de St-6 chevauchait celle de St-5. Le segment partagé par les deux souches ne contenait guère plus que les gènes codant pour le peptide leader ermB et MLS, et était flanqué de courts segments tronqués de séquences liées à la transposase et à la topoisomérase. L'organisation génétique du plus grand contig est représentée sur la figure 2B, et l'analyse des cadres de lecture ouverts (ORF) et d'autres caractéristiques spécifiques aux contig est résumée dans le tableau supplémentaire IV. La séquence contig a montré une forte identité nucléotidique à de grands segments de séquences plasmidiques, en particulier à trois longs tronçons non contigus de 21,9, 3,7 et 1,4 kbp de long au plasmide pRE25 de 50,2 kbp d'*Enterococcus faecalis* (numéro d'accès GenBank NC\_008445.1). Il a également montré une forte homologie avec les segments du plasmide pSM19035 de 28,9 kbp (NC\_006979.1) de *Streptococcus pyogenes* (figure 2B). Les segments homologues étaient flanqués de copies tronquées d'éléments IS, qui ont été répétées à plusieurs positions à la fois dans pRE25 et pSM19035. Comme dans pRE25, quatre ORFs (ORF5 à ORF8 sur la figure 2B) liés à la ségrégation et à la stabilité du plasmide ont été identifiés en aval du gène ermB, suivis d'une série de gènes codant pour des protéines hypothétiques. Plus en aval, un long segment d'ADN contenant une séquence oriT suivie de 15 ORFs (ORF14 à ORF28) a également été noté. Ce dernier segment est considéré être l'unité conjugative minimale du pRE25; il est également présent dans le pSM19035 et d'autres plasmides conjugatifs tels que pIP501 (Kurenbatch *et al.*, 2002). En aval du module de conjugaison, une série de trois répétitions directes (DR) de 9 pb de long a été identifiée: DR1 (TCCAGTTGA) a été répété 8 fois, DR2 (CCAACAGAG) 12 fois et DR3 (CCAACGGAA) 21 fois. DR1 et DR2 ont été séparées par une seule base de thymine (T), et les répétitions de DR2 et DR3 semblaient être intercalées au hasard. Ces DRs ont été trouvées en face de cinq ORFs impliqués dans la réplication du plasmide et le contrôle du nombre de copies (figure 2B). La similitude nucléotidique dans ces ORFs avec les séquences dans pRE25 et pSM19035 (96%) était plus conservée que dans la région des DRs, où aucune homologie significative n'a été trouvée.

L'analyse du génome de St-10 n'a révélé aucun gène connu pour fournir une résistance à la streptomycine et/ou à la néomycine. Par conséquent, les gènes dans lesquels des mutations sont connues pour provoquer une résistance aux aminosides (tels que ceux codant pour la



molécule d'ARNr 16S et la protéine ribosomale S12) ont été analysés et comparés parmi toutes les souches séquencées et à celles des bases de données. Aucune hétérogénéité n'a été détectée dans le gène codant pour l'ARNr 16S; les cinq séquences des présentes souches étaient identiques, voire identiques à celles de la plupart des souches des bases de données. Un changement nucléotidique donnant lieu à une différence d'acides aminés a été observé dans la protéine S12 dans la souche St-10 résistante à la streptomycine/néomycine, mais la même mutation était également présente dans la souche St-2 sensible à la streptomycine et à la néomycine (l'une des souches résistantes à la tétracycline). De plus, ce changement est loin (T132A) de ceux connus pour être impliqués dans la résistance aux aminosides (positions 42, 43 et 87) (Carter *et al.*, 2000). Chez *Bacillus subtilis* (Nishimura *et al.*, 2007) et *Thermus thermophilus* (Demirci *et al.*, 2014), une résistance de faible niveau à la streptomycine a été attribuée à une N7-méthylation déficiente de la molécule d'ARNr 16S en position G527 par le produit du gène rsmG. L'alignement des protéines RsmG déduites de toutes les souches séquencées dans cette étude et d'autres à partir de bases de données, a montré une hétérogénéité à plusieurs positions (Figure 3). En particulier, la séquence protéique de la souche résistante à la streptomycine/néomycine (St-10) a montré quatre changements d'acides aminés exclusifs aux positions 118 (G → E), 137 (A → T), 197 (I → T) et 215 (I → V). Un ou plusieurs de ces changements d'acides aminés pourraient réduire ou abolir l'activité de méthylation du RsmG, déstabilisant la conformation des sites de liaison de la streptomycine (Demirci *et al.*, 2014), augmentant ainsi la résistance à cet antibiotique et à d'autres aminosides.

#### 4.5. Essais de transférabilité des gènes dans le lait fermenté

La transférabilité des gènes tet (S) et ermB des souches de *S. thermophilus* aux souches de *L. delbrueckii* a été menée indépendamment dans des conditions de fabrication de yaourt. Dix lots différents de yaourt ont été produits en utilisant comme starters deux *L. delbrueckii* *subsp. bulgaricus* en combinaison avec trois souches de *S. thermophilus* portant tet (S) et deux souches de *S. thermophilus* portant ermB (figure supplémentaire 3). Le transfert de la résistance aux antibiotiques après la fermentation du lait et pendant le stockage du yogourt (jusqu'à 15 jours) a été vérifié sur de la gélose MRS contenant des antibiotiques appropriés. Cependant, aucune des colonies de *L. delbrueckii* résistantes soit à la tétracycline ou à l'érythromycine n'ont été récupérées.

	1	50
LMG 18311	MTPEDFYMKELGFDLSQKQKQFQRYPELLVEWNEKINLTAITDKDEV	
LMD-9	-----	
St-2 [tet(S)]	-----	
St-5 (ermB)	-----	
St-6 (ermB)	-----	
St-9 [tet(S)]	-----	
St-10 (Sm <sup>r</sup> /Nm <sup>r</sup> )	-----	
	51	100
LMG 18311	FLKHFYDSLAPVLQGHKNSIQLLDIGAGAGFPSPKILCPNLDVTII	
LMD-9	-----	
St-2 [tet(S)]	-----	
St-5 (ermB)	-----	
St-6 (ermB)	-----	
St-9 [tet(S)]	-----	
St-10 (Sm <sup>r</sup> /Nm <sup>r</sup> )	-----	
	101	150
LMG 18311	DSLNRITFLNFLSDELGLSGVHFYHGRAEDFGQDKAFRAQFDIVTARAV	
LMD-9	-----	
St-2 [tet(S)]	-----	
St-5 (ermB)	-----	
St-6 (ermB)	-----	
St-9 [tet(S)]	-----	
St-10 (Sm <sup>r</sup> /Nm <sup>r</sup> )	-----	
	151	200
LMG 18311	ARMQVLSELTIPFLKVGGLIALKAAADQELVDARNALNVLFAPKILNE	
LMD-9	-----	
St-2 [tet(S)]	-----	
St-5 (ermB)	-----	
St-6 (ermB)	-----	
St-9 [tet(S)]	-----	
St-10 (Sm <sup>r</sup> /Nm <sup>r</sup> )	-----	
	201	237
LMG 18311	NYKLPNGDGRNITIIDKKKETPNKYPRRAGIPNKKPL	
LMD-9	-----	
St-2 [tet(S)]	-----	
St-5 (ermB)	-----	
St-6 (ermB)	-----	
St-9 [tet(S)]	-----	
St-10 (Sm <sup>r</sup> /Nm <sup>r</sup> )	-----	

**Figure 3 :** Alignement des compositions d'acides aminés déduites de l'rARN 16S guanine (5277)-N(7)-méthyltransférase codé par les gènes rsmG à partir de différentes souches de *S. thermophilus* de cette étude. Comme référence, les séquences déduites de la protéine rsmG à partir de *S. thermophilus* LMG 18311 et LMD-9 ont été utilisées. Les changements d'acide aminé dans la souche de *S. thermophilus* (St-4) résistante à la streptomycine sont soulignés en bleu clair. En vert, autre changements d'acide aminés dans les souches sensibles à la streptomycine.

## 5. Discussion

Dans la présente étude, la CMI d'un ensemble d'antibiotiques (16) catégorisés "d'une importance critique" (CIAs) et "hautement importants" (HIAs) (WHO, 2017) » de 41 isolats de *S. thermophilus* dérivés de lait cru a été évaluée, en utilisant la méthode de micro-dilution. Les variations des valeurs de la CMI chez *S. thermophilus* de cette étude ont été similaires à celles reportées par d'autres études (Katla *et al.*, 2001; Temmerman *et al.*, 2003; Tosi *et al.*, 2007). Une comparaison des valeurs des CMIs obtenues dans le présent travail et dans la littérature a permis d'identifier 10 souches susceptibles d'héberger des résistances aux antibiotiques: 7 souches résistantes à tétracycline, 2 résistantes à l'érythromycine et à la clindamycine et une résistante à la streptomycine et la néomycine. Les auteurs ont parlé du concept des concentrations critiques cliniques, pour indiquer l'idée des concentrations critiques microbiologiques qui a été introduite par Olsson-Liljequist *et al.* (1997) aux fins d'identifier les souches bactériennes avec des déterminants de résistance acquis et potentiellement transférables. Ce terme a été remplacé, comme proposé par le comité européen pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens (EUCAST), par le seuil écologique ou épidémique (the ECOFF). La CMI est plus élevée que le ECOFF suggère la résistance acquise, dont les gènes additionnés codant à des éléments génétiques mobiles, ceci représente un grand risque pour le transfert horizontal (EFSA, 2012). Un des isolats considéré comme résistant à la tétracycline a montré une valeur de CMI supérieure d'une dilution à l'ECOFF (EFSA, 2012). Un écart d'une dilution de la CMI a été signalé comme se situant dans la gamme de reproductibilité intra-laboratoire normale pour les tests. Ainsi, les souches présentant des valeurs de CMI à un antibiotique une dilution au-dessus de l'ECOFF pourrait encore représenter une population sensible (EFSA, 2012). Une similaire conclusion sur le nombre des souches résistantes, a été abordée par l'analyse de variations des CMIs. Dans tous les cas sauf un, les valeurs de la CMI des antibiotiques pour lesquels des isolats résistants ont été trouvés après une distribution bimodale, à l'absence de mécanisme de résistance dédiés (résistance intrinsèque) le test statistique de normalité doit être abordé (Murray *et al.*, 2013).

La résistance croisée à l'érythromycine et à la clindamycine est connue comme le phénotype de MLS (résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines) (Thumu et Halami, 2012) et elle survient au chevauchement des sites de fixation des antibiotiques au niveau du ribosome (Morosini *et al.*, 2012). En effet, la streptomycine et la néomycine, tous deux sont

des aminosides avec un mode d'action différent. La streptomycine inhibe la synthèse des protéines en se fixant sur l'ARNr 16S et donc en interférant avec la fixation de méthionyl-ARNt formyl à la sous-unité 30S, tandis que la néomycine se lie aux structures duplex d'ARN ou triplex de ARN-ADN (Frieri *et al.*, 2017). La méthylation post-transcriptionnelle de l'ARNr 16S dans certaines positions peut conduire à la résistance concomitante à plusieurs aminosides, y compris la streptomycine et la néomycine (Doi *et al.*, 2016).

L'amplification par PCR conventionnelle a permis l'identification des gènes *tet(S)* et *ermB* dans toutes les souches considérées comme résistantes à la tétracycline et l'érythromycine/la clindamycine, respectivement. Le gène *ermB* est le seul gène de résistance de l'érythromycine/la clindamycine qui a été détecté dans *S.thermophilus* (Wang *et al.*, 2006; Nawaz *et al.*, 2011). En revanche, plusieurs gènes pour la résistance à la tétracycline ont été identifiés dans cette espèce, y compris les gènes codant pour les protéines qui protègent le ribosome comme le gène *tet(S)* et *tet(A)* (Wang *et al.*, 2006 ; Ge *et al.*, 2007 ; van Hoek *et al.*, 2008 ; Rizzotti *et al.*, 2009), ou la pompe d'efflux comme les gènes *tet(L)* et *tet(A)* (Rizzotti *et al.*, 2009 ; Arioli *et al.*, 2014). Bien que les techniques conventionnelles telles que la PCR et l'hybridation soient utiles pour la caractérisation de les gènes de résistance aux antibiotiques et leurs éléments associés, l'utilisation du séquençage et de l'analyse du génome entier, qui devient abordable pour la plupart des laboratoires, se propage rapidement en raison de sa réponse rapide et ses puissantes capacités d'analyse (TaitKamradt *et al.*, 2009; Flórez *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017).

Dans la présente étude, l'analyse du génome entier des cinq souches examinées a confirmé la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dédiés dans les cas de résistance à la tétracycline et à l'érythromycine / à la clindamycine, mais a exclu la présence d'un tel dédié, aux gènes responsables de la résistance à la streptomycine/néomycine, car aucun gène responsable de la résistance aux aminosides de ceux rapportés dans la littérature sur les espèces de bactéries lactiques (Ammor *et al.*, 2008; Fraqueza, 2015; Jaimee et Halami, 2016) n'a été observé.

Par ailleurs, la séquence nucléotidique du contig de la souche St-5 portant le gène *ermB*, a présenté une homologie étendue aux séquences dérivées de plasmides, en particulier aux longs segments de pRE25 (Schwarz *et al.*, 2001) et pSM19035 (Soberon *et al.*, 2011). Le plasmide pRE25 est un plasmide conjugatif qui s'est avéré transférable à *E. faecalis* et

*Listeria innocua* et *Lactococcus lactis* au moyen d'une région de transfert qui semble similaire à celle de pIP501 (**Schwarz et al., 2001**).

L'implication du plasmide pRE25 dans le transfert du gène *ermB* à *Lactobacillus johnsonii* a été déjà suggérée précédemment (**Florez et al., 2006**). La présence de gènes de résistance aux antibiotiques chez *S. thermophilus* pourrait être due aux systèmes de transfert promiscuité de plasmides conjugatifs tels que pRE25 ou pSM19035 (**Rizzotti et al., 2009**), mais la contribution à l'adaptation (et à l'évolution) de cette espèce de cette espèce grâce à un système de compétences naturelles autrement inefficace (**Gardan et al., 2009**) ne peut être exclue.

Dans les deux cas, la présence dans *S. thermophilus* de courtes répétitions palindromiques régulièrement espacées (CRISPR) et les gènes codant pour les systèmes associés à CRISPR (Systèmes CRISPR-Cas) (voir tableau supplémentaire 3), qui ont montré qu'ils dégradent l'ADN des phages et des plasmides (**Garneau et al., 2010**), ne semble pas être une barrière impénétrable pour l'incorporation de segments de plasmides contenant des gènes de résistance aux antibiotiques.

L'organisation génétique entière du contig porteur d'*ermB* ressemblait à celle des ICE (éléments intégratifs et conjugatifs) identifiés dans les espèces de *Streptococcus* (**Beres et Musser, 2007; Camilli et al., 2008; Brenciani et al., 2011; León-Sampedro et al., 2016**). Les ICE, dont certains portent des gènes *ermB*, sont composés de modules fonctionnels qui correspondent à des segments d'ADN et à des gènes ou à un groupe de gènes impliqués dans les processus de maintenance et de dissémination (**Carraro et Burrus, 2014**).

Les modules essentiels de la structure de base de l'ICE sont ceux d'intégration/excision, de réplication/traitement de l'ADN, de sécrétion d'ADN et de régulation. Deux ICE étroitement apparentés -ICESt1 et ICESt3- ont déjà été identifiés chez *S. thermophilus* (**Carraro et al., 2011**). Le ICESt1 a d'abord été décrit comme une région polymorphe de 35 kpb dans le génome de *S. thermophilus* CNRZ 368 (**Roussel et al., 1997**), tandis que ICESt3 a été initialement identifié chez *S. thermophilus* CNRZ 385 (**Pavlovic et al., 2004**). Ces deux éléments liés sont également liés à d'autres ICE de différentes espèces de *Streptococcus* (**Carraro et Burrus, 2014**). Si un ICE est présent dans St-5, sa séquence et sa structure sont complètement différentes de celles déjà rapportées chez *S. thermophilus*. Cependant, il reste à déterminer si l'ICE est complet ou contient des modules ou des structures supplémentaires dans d'autres contigs.

Le plus grand risque de présence dans les aliments de bactéries lactiques hébergeant des gènes de résistance aux antibiotiques transmissibles est la possibilité que ces derniers soient transférés à des agents pathogènes lors de la fabrication des aliments ou lors du transit via le tractus gastro-intestinal (**Marshall et Levy, 2011**). Dans les conditions des présents travaux, ni tet (S) ni ermB n'ont été transférés à *L. delbrueckii*. Puisque le contig de St-5 portant ermB semblait héberger tous les composants de l'unité conjugative minimale putative de pRE25 (**Schwarz et al., 2001**), et ce plasmide s'est avéré transférable sous ses formes réplivative (en tant que plasmide) et intégrative (Schwarz et al., 2001), le transfert de l'ermB de cette souche à d'autres espèces et souches a été jugé réalisable. En l'absence de preuve expérimentale jusqu'à preuve du contraire, le transfert de la résistance à d'autres microorganismes d'origine alimentaire pourrait encore être possible, bien que *S. thermophilus* se soit précédemment révélé négatif pour le transfert de la résistance à la tétracycline à *E. faecalis* et *L. innocua* sous des conditions de conjugaison similaires (**Rizzotti et al., 2009**).

## 6. Conclusion

La conclusion de ce travail colossal a été présentée sous forme d'une synthèse des principaux résultats obtenus, à commencer par la détection d'une résistance acquise aux antibiotiques: tétracyclines, érythromycine/clindamycine et streptomycine/néomycine chez quelques souches parmi 41 isolats de *S. thermophilus* dérivés du lait cru. Les auteurs rapportent que des corrélations ont été observées entre la résistance à la tétracycline et à l'érythromycine/clindamycine et la présence de tet (S) et d'ermB, respectivement. L'analyse du génome a confirmé la présence à la fois des gènes tet (S) et d'ermB et a identifié des séquences liées à l'IS flanquant des gènes de résistance. D'une manière ou d'une autre, les auteurs pensent que ces séquences sont impliquées dans la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Par ailleurs, l'analyse du contig hébergeant le gène ermB a identifié une structure génétique très similaire aux segments de pRE25 d'*E. faecalis* et d'autres plasmides conjugatifs ressemblant aux ICE dans les espèces de *Streptococcus*. Bien qu'aucune preuve directe n'ait été obtenue, l'analyse du génome a suggéré qu'une déficience dans la méthylation de la molécule d'ARNr 16S, causée par des substitutions d'acides aminés dans la RsmG méthyltransférase, peut expliquer une résistance modérée à la streptomycine et une forte résistance à la néomycine dans une souche. Enfin,

aucun transfert de tet (S) ou d'ermB de *S. thermophilus* à *L. delbrueckii* n'a été observé dans les conditions de fabrication et de stockage du yaourt.

Selon les auteurs, la faible relation phylogénétique des souches de cette étude avec les starters de *S. thermophilus* utilisés suggère que les souches du même écosystème exemptes de résistances aux antibiotiques seraient une bonne source pour la recherche de nouveaux candidats ou de starters avec des propriétés nouvelles ou améliorées pour être utilisés dans les fermentations laitières.

#### - Comparaisons possibles entre les deux articles -

Dans l'article de **Tosi et al. (2006)**, 6 antibiotiques (érythromycine, clindamycine, streptomycine, gentamicine, tétracycline et l'ampicilline) ont été testés sur 64 souches de *S. thermophilus*, tandis que dans l'étude faite par **Florez et Mayo, (2017)**, ils ont utilisé 16 antibiotiques (ampicilline, ciprofloxacine, clindamycine, chloramphénicol, érythromycine, gentamicine, kanamycine, linézolide, néomycine, pénicilline, rifampicine, streptomycine, tétracycline, triméthoprim, vancomycine et virginiamycine), pour tester la susceptibilité de 41 isolats de *S. thermophilus* dont ils ont identifié 10 souches seulement qui portent des gènes de résistance aux antibiotiques mentionnés ci-dessus. Les valeurs des CMI observées ont été déterminées en utilisant la méthode de micro-dilution dans les deux études.

**Tosi et al. (2006)** ont trouvé 4 souches résistantes à la tétracycline avec des CMI de 16-32 µg/ml, pour l'érythromycine, 4 souches résistantes avec la valeur de CMI 16-32 µg/ml et autres 4 souches sensibles avec des CMI de 256µg/ml, une souche résistante à la streptomycine avec une CMI de 128µg/ml. Les souches restantes étaient résistantes à la clindamycine avec des CMI de 0.03-0.125µg/ml et aucune souche n'a présenté résistance à la gentamicine, à l'ampicilline. Alors que, **Florez et Mayo. (2017)** ont trouvé 7 souches résistantes à la tétracycline avec des CMI  $\geq 8\mu\text{g/ml}$ , 2 souches résistantes à l'érythromycine avec des CMI  $\geq 128\mu\text{g/ml}$ , 2 souches résistantes à la clindamycine avec des CMI  $\geq 16\mu\text{g/ml}$ , une seule souche résistante à la streptomycine avec une CMI  $\geq 128\mu\text{g/ml}$  et une souche a présenté une résistance à la néomycine.

**Tosi et al. (2006)** ont effectué la différence entre les 3 méthodes (la micro-dilution en bouillon, la diffusion par disque et le E-test) et ils ont constaté que la méthode de micro-dilution est une méthode simple et fiable pour déterminer les CMI pour un grand nombre

d'isolats de *S. thermophilus*. Cependant, la méthode du E-test est plus valable que la méthode de micro-dilution grâce à sa simplicité au niveau technique. Par contre, la méthode de diffusion par disque ne donne pas une CMI exacte, cette méthode est capable de distinguer les isolats résistants, de plus, les disques sont moins coûteux et facile à appliquer et il est possible de tester différents antibiotiques dans la même boîte. À la fin, ils ont suggéré que les souches résistantes doivent subir des analyses génétiques pour identifier les gènes de résistance et leur capacité d'être transférés, et ceci a été démontré par **Florez et Mayo. (2017)**; où l'analyse du génome de 5 souches testées en utilisant la PCR conventionnelle a confirmé la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans les souches résistantes à la tétracycline et l'érythromycine/la clindamycine, mais établie surtout sur les gènes responsables à la résistance à la streptomycine/néomycine.

**Tosi et al. (2006)** ont signalé que la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans les éléments génétiques mobiles présente un risque élevé dans la dissémination de la résistance, dont les expériences ont été faites dans l'étude de **Florez et Mayo. (2017)**, où ils ont supposé que la présence de gènes de résistance aux antibiotiques chez *S. thermophilus* peut être due à des systèmes de transfert de type plasmides conjugatifs, tels que les plasmides pRE25 ou pSM19035. En l'absence de preuves expérimentales dans cette étude, le transfert de la résistance à d'autres microorganismes d'origine alimentaire pourrait encore être possible, pourtant *S. thermophilus* a été précédemment révélé négatif pour le transfert de la résistance de la tétracycline à *Enterococcus faecalis* et *Listeria innocua*. De même le plus grand risque de présence de bactéries lactiques portant des gènes transmissibles de résistance aux antibiotiques dans les aliments est la possibilité que ces derniers soient transférés à des agents pathogènes lors de la production des aliments ou lors du passage à travers le tractus gastro-intestinal. **Tosi et al. (2006)** ont conclu que la sélection des microorganismes pour être utilisés comme additifs alimentaires, devrait être orienté vers le microorganisme le moins résistant (**FEEDAP Panel, 2005**).



## *Conclusion*

## Conclusion

L'organisation mondiale de la santé (OMS) avait reconnu la nature mondiale de la résistance aux antibiotiques. Les humains sont exposés à des bactéries résistantes provenant de la production animale par des voies multiples, dont la consommation de produits alimentaires contaminés, le contact direct homme/animal dans les fermes et les abattoirs ainsi que la transmission indirecte par le biais de l'environnement (OMS, 2017).

La confirmation de la présence dans différents aliments de bactéries antibio-résistantes a suscité des inquiétudes concernant l'impact des bactéries alimentaires en tant que réservoirs de gènes de résistance; et comment elles peuvent être impliquées dans la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques.

Durant les deux dernières décennies, un grand intérêt a été surtout porté sur les produits laitiers fermentés élaborés grâce aux activités fermentaires des bactéries lactiques.

*S. thermophilus* est parmi les espèces lactiques dont certains travaux de recherches ont signalé sa résistance aux antibiotiques, notamment ceux de Tosi et al. (2006) et de Florez et Mayo, (2017).

L'étude de Tosi et al. (2006) était focalisée sur la mise au point de techniques permettant l'évaluation de la résistance aux antibiotiques des *S. thermophilus*, en particulier la formulation d'un nouveau milieu de culture (milieu SSM), pour la détermination des CMI, par trois méthodes différentes (micro-dilution, E-Test, diffusion sur gélose). Ils ont pu définir huit souches avec une résistance phénotypique atypique à un ou plusieurs des antibiotiques testés. Ces souches doivent être soumises à une caractérisation plus poussée pour évaluer la base génétique de la résistance selon les auteurs.

En revanche, l'étude de Florez et Mayo, (2017) était distinguée par son aspect moléculaire, en utilisant différentes techniques qui ont permis la détection d'une résistance acquise et la localisation dans le génome de certains isolats isolés du lait cru des gènes tet (S) et d'ermB. Ces derniers sont responsables de la résistance à la tétracycline et à l'érythromycine respectivement. Autres séquences qui semblent être impliquées dans la propagation des

gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries ont aussi été identifiées chez les mêmes isolats.

Les aspects moléculaires dans de telles études sont d'une importance extrême, car ils permettent d'effectuer un contrôle et une surveillance des bactéries alimentaires qui sont susceptibles de porter et véhiculer des gènes de résistance aux antibiotiques.

## *Références Bibliographiques*

- **Acar-Soykut E., Tayyarcan E.K., & Boyaci I.H., 2018.** A simple and fast method for discrimination of phage and antibiotic contaminants in raw milk by using Raman spectroscopy. *Journal of Food Science and Technology*, **55**(1) : 82-89.
- **Alvarez-Cisneros Y.M., & Ponce-Alquicira E., 2019.** Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria. In: **Kumar Y., 2019.** Antimicrobial Resistance-A Global Threat, Eds. IntechOpen, London.
- **Allen K.H., Donato J.J., Wang H.H., Cloud-Hansen K.A., Davies J., & Handelsman J., 2010.** Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, **8**(4): 251-259.
- **Ammor M.S., Florez A.B., & Mayo B., 2007.** Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, **24**: 559-570.
- **Ammor M.S., & Mayo B., 2007.** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, **76**(1): 138-146.
- **Arioli S., Scala G.D., Remagni M.C., Stuknyte M., Colombo S., Guglielmetti S., De Noni I., Ragg E., & Mora D., 2016.** *Streptococcus thermophilus* urease activity boosts *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* homolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **247**: 55-64.
- **Axelsson L., 2004.** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen S., Wright A.V., & Ouwehand A., Eds., *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3<sup>rd</sup> Edition, Marcel Dekker, New York, 1-67.
- **Balirda A., Robert H., Jebbar M., Blanco C., Deschamps A., & Le Marrec C., 2003.** Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila*. *International Journal of Food Microbiology*, **84**: 13-20.
- **Braiek O.B., & Smaoui S., 2019.** "Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics". *BioMed Research International*, **2019**: 1-13.
- **Burgess C., O'Connell-Motherway M., Sybesma W., Hugenholtz J., & van Sinderen D., 2004.** Riboflavin Production in *Lactococcus lactis*: Potential for In Situ Production of Vitamin-Enriched Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(10): 5769-5777.
- **Buron-Moles G., Chailyan A., Dolejs I., Forster J., & Miks M.H., 2019.** Uncovering carbohydrate metabolism through a genotype-phenotype associate study of 56 lactic acid bacteria genomes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103** (18).
- **Carr F.J., Chill D., & Maida N., 2002.** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Review in Microbiology*, **28**(4): 281-370.
- **Castillo Martinez F.A., Balcuinas E.M., Salgado J.M., Dominguez Gonzalez J.M., Converti A., & Oliveira R.P de S., 2013.** Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, **30**(1): 70-83.
- **Chaves A.C.S.D., Fernandez M., Lerayer A.L.S., Mierau I., Kleerebezem M., & Hugenholtz J., 2002.** Metabolic Engineering of Acetaldehyde Production by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(11): 5656-5662.
- **Chen C., Zhao S., Hao G., Yu H., Tian H., & Zhao G., 2017.** Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavor: a review. *International Journal of Food Properties*, **20**: S316-S330.
- **Chopra I., & Roberts M., 2001.** "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65**: 232-260.

- **De Castilho N.P.A., Nero L.A., & Todorov S.D., 2019.** Molecular screening of beneficial and safety determinants from bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal calabresa. *Letters in Applied Microbiology*, **69** : 204-211.
- **Delorme C., 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, **126**: 274-277.
- **Desmazeaud M., 1983.** L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait*, **63**: 276-316.
- **De Vuyst L., 2000.** Technology Aspects Related to the Application of Functional Starter Cultures. *Food Technology and Biotechnology*, **38**(2): 105-112.
- **Domingos-Lopes M.F.P., Sstanton C., Ross P.R., Dapkevicius M.L.E. & Silva C.C.G., 2017.** Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*, **63**: 178-190.
- **Donoghue D.J., 2003.** Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns?. *Poultry Science*, **82**(4): 618-621.
- **Eaton T.J., & Gasson M.J., 2001.** Molecular Screening of Enterococcus Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolated. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(4): 1628-1635.
- **European Food Safety Authority (EFSA), 2012.** EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, **10**(6): 2740.
- **European Food Safety Authority (EFSA), 2018.** EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed: Guidance on the characterization of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA journal*, **16**(3): 5206.
- **Egervarn M., Lindmark H., Olsson J., & Roos S., 2010.** Transferability of a tetracycline resistance gene from probiotic *Lactobacillus reuteri* to bacteria in the gastrointestinal tract of humans. *Antonie van Leeuwenhoek*, **97**: 189-200.
- **Facklam R., 2002.** "What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes". *Clinical Microbiology Reviews*, **15**(4): 613-630.
- **Flórez A.B., Tosi L., Danielsen M., von Wright A., Bardowski J., Morelli Ll., & Mayo B., 2008.** Resistance-susceptibility profiles of *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* strains to eight antibiotics and proposition of new cut-offs. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, **3** (4): 249-256.
- **Gagnaire V., 2004.** Survey of Bacterial proteins released in cheese: a proteomic approach. *International Journal of Food Microbiology*, **94**(2) : 185-201.
- **Giraffa G., Paris A., Valvaci L., Gatti M., & Neviani E., 2001.** Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, **91**: 937-943.
- **Garcia-Cano I., Rocha-Mendoza D., Ortega-Anaya J., Wang K., Kosmerl Ee., & Jimenez-Flores R., 2019.** Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**: 5243-5257.
- **Gupta V., & Garg R., 2009.** Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **27**(3), 202.
- **Hafeez Z., Cakir-Kiefer C., Girardet J-M., Jardin J., Perrin C., Dary A., & Miclo L., 2013.** Hydrolysis of milk-derived bioactive peptides by cell-associated extracellular peptidases of *Streptococcus thermophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**: 9787-9799.

- **Hatti-Kaul R., Chen L., Dishisha T., & Enshasy H.E., 2018.** Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters*, **365** (20).
- **Hermier J., 1992.** Les groupes microbiens d'intérêt laitiers. Eds., CEPIL, Paris, France, 568.
- **Hong C., Shuang Z., Miao X., Min Z., Xin-Tong L., Hong-Ling D., Chun-Li M., & Zhen F., 2015.** Short Communication: Evaluation of amino acid consumption and necessary profiles of *Streptococcus thermophilus* T1C2 in controlled pH batch fermentations. *Journal of Dairy Science*, **98**: 1-6.
- **Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D., Leblond-Bouget N., Decaris B., Bolotin A., Delorme C., Ehrlich S.D., Guedon E., Monnet V., Renault P., & Kleerebezem M., 2005.** New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophiles* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Review*, **29**: 435-463.
- **Horvath P., Couté-Monvoisin A.C., Romero D.A., Boyaval P., Fremaux C., & Barrangou R., 2009.** Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *International Journal of Food Microbiology*, **131**: 62-70.
- **Hugenholtz J., 1993.** Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **12**: 165-178.
- **Ishihara K., Nakajima K., Kishimoto S., Atarashi F., Muramatsu Y., Hotta A., Ishii S., Takeda Y., Kikuchi M., & Tamura Y., 2013.** Distribution of antimicrobial-resistant lactic acid bacteria in natural cheese in Japan. *Microbiology and Immunology*, **57**: 684-691.
- **Iyer R., Tomar S.K., Maheswari U., & Singh R., 2010.** *Streptococcus thermophiles* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **20**: 133-141.
- **Kandler O., 1983.** Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Journal of Antonie van Leeuwenhoek*, **49**(3): 209-224.
- **Karacer F., Hamed I., Ozogul F., Glew R.H., & Ozcengiz D., 2017.** The function of probiotics on the treatment of ventilator-associated pneumonia (VAP): facts and gaps. *Journal of Medical Microbiology*, **66**(9): 1275-1285.
- **Kawamura Y., Hou X.G., Sultana F., Miura H., & Ezaki T., 1995.** Determination of 16S Rna Sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and Phylogenetic Relationships among Members of the Genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**(2): 406-408.
- **Kushiro A., Chervaux C., Cools-Portier S., Perony A., Legrain-Raspaud S., Obis D., Onoue M., & van de Moer A., 2009.** Antimicrobial susceptibility testing of lactic acid bacteria and bifidobacteria by broth microdilution method and E-test. *International Journal of Food Microbiology*, **132**: 54-58.
- **Kumari A., Angmo K., Monika, Bhalla T. C., 2016.** Probiotic attributes of indigenous *Lactobacillus* spp. Isolated from traditional fermented foods and beverages of north-western Himalayas using in vitro screening and principal component analysis. *Journal of Food Science and Technology*, **53**(5): 2463-2475.
- **Liu W., Pang H., Zhang H., & Cai Y., 2014.** Biodiversity of Lactic Acid Bacteria, In: **Zhang H., & Cai Y., 2014.** *Lactic Acid Bacteria*, Eds. Springer. Etats-Unis, 103-203.
- **Mathur S., & Singh R., 2005.** Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria- a review. *International Journal of Food Microbiology*, **105**: 281-295.
- **Marshall V.M., & Tamime A.Y., 1997.** Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *International Journal of Dairy Technology*, **50**(1): 35-41.

- **Markakiou S., Gaspar P., Johansen E., Zeidan A.A., & Neves R., 2020.** Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophiles* for new biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, **61**: 142-152
- **Martin M.C., Fernandez M., Linares D.M., & Alvarez M.A., 2005.** Sequencing, characterization and transcriptional analysis of the histidine decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*. *Microbiology*, **151**: 1219-1228.
- **Masood M. I., Qadir M. I., Shirazi J. H., & Kha, I. U., 2010.** Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Critical Reviews in Microbiology*, **37**(1): 91-98.
- **McSweeney P.L.H., & Sousa M.R., 2000.** Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, **80**: 293-324.
- **Meucci A., Rossetti L., Zago M., Monti L., Giraffa G., Carminati D., Tidona F., 2018.** Folate biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* during growth in milk. *Food microbiology*, **69**: 116-122.
- **Mora D., Monnet C., Parini C., Guglielmetti S., Mariani A., Pintus P., Molinari F., Daffonchio D., & Manachini P.L., 2005.** Urease Biogenesis in *Streptococcus thermophilus*. *Research in Microbiology*, **156**: 897-903.
- **Nesme J., & Simonet P., 2015.** “The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria”. *Journal of Environmental Microbiology*, **17**(4): 913-930.
- **Normark B.H., & Normark S., 2002.** Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, **252**: 91-106.
- **Nesme J., & Simonet P., 2015.** “The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria”. *Journal of Environmental Microbiology*, **17**(4): 913-930.
- **Olson N., 1990.** The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. *FEMS Microbiology Letters*, **87**(1-2): 131-147.
- **Ozer E., & Kesenkas H., 2019.** The effect of using different starter culture combinations on ripening parameters, microbiological and sensory properties of Mihalic cheese. *Journal of Food Science and Technology*, **56**(3): 1202-1211.
- **Pessione E., 2012.** Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **2**(86).
- **Qiao Y., Liu G., Leng C., Zhang Y., Lv X., Chen H., Sun J., & Feng Z., 2018.** Metabolic profiles of cysteine, methionine, glutamate, glutamine, arginine, aspartate, asparagine, alanine and glutathione in *Streptococcus thermophiles* during pH controlled batch fermentations. *Scientific Reports*, **8**(1).
- **Qiao Y., Liu G., Lv X., Fan X., Zhang Y., Meng L., Ai M., & Feng Z., 2020.** Metabolic Pathway Profiling in Intracellular and Extracellular Environments of *Streptococcus thermophiles* During pH-Controlled Batch Fermentations. *Frontiers in Microbiology*, **10**: 3144.
- **Rizzoti L., La Gioia F., Dellaglio F., & Torriani S., 2009.** Characterization of Tetracycline-Resistant *Streptococcus thermophilus* Isolates from Italian Soft Cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**(12) : 4224-4229.
- **Rodriguez-Serrano G.M., Garcia-Garibay M., Cruz-Guerrero A.E., Gomez-Ruiz L., Ayala-Nino A., Ovando-Castaneda A., & Gonzalez-Olivares L.G., 2018.** Protolytic System of *Streptococcus thermophiles*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**(10): 1581-1588.



- **Rossetti L., Carminati D., Zogo M., & Giraffa G., 2009.** A Qualified Presumption of Safety approach of the safety assessment of Grana Padano whey starters. *International Journal of Food Microbiology*, **130**: 70-73.
- **Ruas-Madiedo P., Tuinier R., Kanning M., & Zoon P., 2002.** Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* on the viscosity of fermented milks. *International Dairy Journal*, **12**(8): 689-695.
- **Ruiz Rodriguez L.G., Mohamed F., Bleckwedel J., Medina R., De Vuyst L., Hebert E.M., & Mozzi F., 2019.** Diversity and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Wild Fruits and Flowers Present in Northern Argentina. *Frontiers in Microbiology*, **10**: 1091.
- **Saez-Lara M.J., Gomez-Llorente C., Plaza-Diaz J., & Gil A., 2015.** The role of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Other Related Diseases: A Systematic Review of Randomized Human Clinical Trials. *International Journal of BioMedical Research*, **2015**: 1-15.
- **Sanlier N., Gokcen B., & Sezgin A.C., 2017.** Health benefits of fermented foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, **59**(3): 506-527.
- **Savijoki K., Ingmer H., & Varmanen P., 2006.** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **71**(4): 394-406.
- **Settachaimongkon S., Nout M.J.R., Autunes Fernandes E.C., Hettinga K.A., Vervoort J.M., van Hooijdonc T.C.M., Zwietering M.H., Smid E.J. & van Valenberg H.J.F., 2014.** Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yogurt. *International Journal of Food Microbiology*, **177**: 29-36.
- **Silva L.F., Sunakozawa T.N., Amaral D.M.F., Casella T., Nogueira M.C.L., Lindner J.D.D., Botari B., Gatti M., & Penna A.L.B., 2019.** Safety and technological application of autochthonous *Streptococcus thermophilus* cultures in the buffalo Mozzarella cheese. *Food Microbiology*, **87**: 103383.
- **Sirichoat A., Florez A.B., Vazquez L., Buppasiri P., Panya M., Lulitanond V., & Mayo B., 2020.** Antibiotic Susceptibility Profiles of Lactic Acid Bacteria from the Human Vagina and Genetic Basis of Acquired Resistances. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**: 2594.
- **Shokryazdan P., Faseleh Jahromi M., Liang J.B, & Ho Y.W., 2017.** Probiotics: From Isolation to Application. *Journal of the American College of Nutrition*, **36**(8): 666-676.
- **Steele J., Broadbent J., & Kok J., 2013.** Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Current Opinion in Biotechnology*, **24**: 135-141.
- **Stsepetova J., Taelma H., Smidt I., Hutt P., Lapp E., Aotaht E., & Mandar R., 2017.** Assessment of phenotypic and genotypic antibiotic susceptibility of vaginal *Lactobacillus* sp. *Journal of Applied Microbiology*, **123**: 524-534.
- **Tanasupawat S., Phoottosavako M., & Keeratipibul S., 2015.** Characterization and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **5**(03): 006-012.
- **Tarrah A., Treu L., Giaretta S., Duarte V., Corich V., & Giacomini A., 2018.** Differences in Carbohydrates Utilization and Antibiotic Resistance Between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* Strains Isolated from Dairy Products in Italy. *Current Microbiology*, **75**(10).

- **Toe C.J., Foo H.L., Loh T.C., Mohamad R., Abdul Rahim R., & Idrus Z., 2019.** Extracellular Proteolytic Activity and Amino acid Production by Lactic acid Bacteria Isolated from Malaysian Foods. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**: 1777.
- **Torino M.I., de Valdez G.F., & Mozzi F., 2015.** Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, **6**.
- **Tsakalido E., & Papadimitrio K., 2011.** Stress Responses of Lactic Acid Bacteria. Eds., Springer, 2011<sup>th</sup> Edition, USA, 552.
- **Van den Bogaard P.T.C., Hols P., Kuipers O.P., Kleerebezem M., & de Vos W.M., 2004.** Sugar Utilisation and Conservation of the gal-lac Gene Cluster in *Streptococcus thermophilus*. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**: 10-17.
- **Van Mastrigt O., Abee T., Lillevang S.K., & Smid E.J., 2018.** Quantitative physiology and aroma formation of a dairy *Lactococcus lactis* at near-zero growth rates. *Food Microbiology*, **73**: 216-266.
- **Vilander A.C., & Dean G.A., 2019.** Adjuvant Strategies for Lactic Acid Bacterial Mucosal Vaccines, **7**(4): 150.
- **Wu C., Huang J., & Zhou R., 2017.** Genomics of lactic acid bacteria: status and potential application. *Critical Review in Microbiology*, **43** (4):393-404.
- **Wu Q., & Shah N.P., 2018.** Comparative mRNA-Seq Analysis Reveals the Improved EPS Production Machinery in *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275 During Optimized Milk Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, **9**.
- **Yamauchi R., Maguin E., Horiuchi H., Hosokawa M., & Sasaki Y., 2019.** The critical role of urease in yogurt fermentation with various combinations of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*, **102**: 1-11.
- **Zhu Y., Zhang Y., & Li Y., 2009.** Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **83**(4): 597-610.
- **Zielinska D., & Kolozyn-Krajewska D., 2018.** Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. *BioMed Research International*, **2018**: 1-15.