

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle. BADAOUI MANSOUR Safaa & Mlle. BELALIA Nada Yasmine

Pour l'obtention du diplôme de

Master en biologie

Spécialité: Microbiologie Appliquée

Thème:

**Formation de biofilms par les bactéries d'origine
alimentaire résistantes aux antibiotiques.**

Déposé en Juillet 2021

Jury:

Président	BENOURED F.	Maitre de Conférences [A]	U. Mostaganem
Encadreur	BENNAMA R.	Maitre de Conférences [B]	U. Mostaganem
Examineur	BELKACEMI L.	Maitre de Conférences [A]	E.S.A. Mostaganem

Année Universitaire: 2020-2021

Remerciements

Nous voudrions dans un premier temps exprimer notre gratitude et nos remerciements les plus intenses à notre encadreur de mémoire, Dr. BENNAMA R, maître de conférences au département de biologie, d'avoir accepté de nous encadrer et d'avoir bien orienté ce travail. Nous la remercions aussi pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont été une source enrichissante pour la mise au point de ce mémoire, en lui donnant vie.

Nous tenons à remercier l'ensemble des membres de jury, Dr. BENOURED F, maître de conférences au département de biologie, et Dr. BELKACEMI L, maître de conférences à l'école supérieure d'agronomie de Mostaganem, pour avoir accepté de participer dans le jury, afin d'examiner et juger ce travail.

Nous remercions également, Nos parents (Belalia N et Belalia M, Badaoui Mansour T et Badaoui Mansour N), pour leur soutien constant et leurs encouragements. Pour leur amour inestimable, leurs sacrifices, leur confiance, leur soutien et toutes les valeurs qu'ils ont su nous inculquer. Ainsi que nos sœurs et nos frères qui ont toujours été là pour nous.

Nous n'avons pas pu réaliser une étude expérimentale, en raison des conditions de travail difficiles, liées à la pandémie du Covid-19.

Table des Matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures	v
Introduction.....	1
Partie I : Revue bibliographique	
I. Les antibiotiques	3
1. Définition et activités	3
2. Mécanismes d'action	4
3. Résistance aux antibiotiques.....	5
3.1. Résistance naturelle	5
3.2. Résistance acquise	5
3.3. Mécanismes biologiques de la résistance	8
II. Résistance aux antibiotiques dans un contexte alimentaire	10
1. Aperçu général	10
2. Présence des bactéries antibio-résistantes dans les aliments	13
2.1. Escherichia coli	14
2.2. Salmonella	14
2.3. Staphylococcus aureus	15
2.4. Les bactéries lactiques	15
III. Les Biofilms	17
1. Signaux et communications cellulaires	17
2. Définition du biofilm	17
3. Étapes de formation du biofilm.....	18
3.1. Attachement initial ou réversible.....	19
3.2. Attachement irréversible	19
3.3. Formation de micro-colonies	19
3.4. Maturation du biofilm	20
3.5. Dispersion	20
4. Biofilms et la résistance aux antibiotiques.....	21
4.1. Aspects généraux	21
4.2. Aspects sous-jacents de la résistance	23
4.2.1. Quorum Sensing	23
4.2.2. Modification de l'expression génique et les interactions interspécifiques	24
5. Aliments et les biofilms	25
5.1. Mécanismes de contamination des aliments par les biofilms	25
5.2. Impact des biofilms sur la production alimentaire	26
Partie II: Présentation d'articles scientifiques	
Article 1: <i>Staphylococcus aureus</i> Isolated From Handmade Sweets: Biofilm Formation, Enterotoxigenicity and Antimicrobial Resistance (Kroning et al., 2016).....	28

Article 2: Antibiotic Susceptibility and Ability to Form Biofilm of <i>Listeria Monocytogenes</i> Strains Isolated From Frozen Vegetables (Skowron et al., 2019)	43
Conclusion.....	55
Références bibliographiques	57

Résumé

La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pour la sécurité alimentaire, et les animaux destinés à l'alimentation sont considérés comme des réservoirs clés de bactéries résistantes aux antibiotiques. Il est donc essentiel de comprendre les origines de cette résistance. Les environnements alimentaires sont les meilleurs sites pour la fixation microbienne et la formation de biofilm, les micro-organismes d'un biofilm vont acquérir certains caractères leur permettant de persister dans les surfaces alimentaires contenant suffisamment de nutriments pour la croissance et l'attachement microbiens, où ils deviennent une source de contamination croisée et de maladies d'origine alimentaire.

Les articles de recherche de **Kroning et al., (2016)** et **Skowron et al., (2019)** présentés dans ce travail de master ont rapporté et confirmé la présence de bactéries antibio-résistantes et productrices de biofilm dans les produits alimentaires, tels que les bonbons faits à la main et les légumes frais et surgelés. **Kroning et al., (2016)** ont signalé dans les bonbons faits à la main la présence de *Staphylococcus aureus* à coagulase positive. Ces derniers ont évalué la présence des gènes d'enterotoxines (ica A et icaD) qui sont liés à la formation de biofilm, comme ils ont évalué la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques suivants: ampicilline, tétracycline, érythromycine, gentamycine. De même, les travaux effectués par **Skowron et al., (2019)** ont évalué la sensibilité aux antibiotiques de *Listeria monocytogenes* isolée d'un mélange de légumes congelés, par la méthode de diffusion par disque, suivie d'évaluation de la formation de biofilm. Par ailleurs, Ils affirment que la plupart des souches étudiées étaient sensibles aux antibiotiques, mais que certaines étaient résistantes à la pénicilline, au méropénème, à l'érythromycine et au cotrimoxazole. Ainsi, parmi les souches étudiées, il y avait une tendance très faible à la diminution de l'intensité de formation de biofilm, avec une augmentation de leur résistance aux antibiotiques. Ce qui signifie que l'apparition de *L. monocytogenes* dans la production alimentaire représente une menace et un danger pour les consommateurs.

Mots clés: bactéries résistantes aux antibiotiques, aliments, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, formation de biofilm, sensibilité.

Abstract

Antibiotic resistance is one of the most serious threats to food security today; food animals are considered as key reservoirs of antibiotic resistant bacteria. It is therefore essential to understand the origins of this resistance. Food environments are the best sites for microbial uptake and biofilm formation. Microorganisms in a biofilm will acquire some traits allowing them to persist in surfaces food containing enough nutrients for growth and microbial attachment, where they become a source of cross-contamination and foodborne illness.

The research papers of Kroning **et al.**, (2016) and Skowron **et al.**, (2019) presented in this master's work reported and confirmed the presence of antibiotic resistant and biofilm-producing bacteria in food products, such as handmade sweets and fresh and frozen vegetables. **Kroning et al. (2016)** reported the presence of coagulase positive *Staphylococcus aureus* in handmade sweets. They assessed the presence of enterotoxin genes (*ica A* and *icaD*) which are linked to biofilm formation, as they assessed the resistance of *S. aureus* to the following antibiotics: ampicillin, tetracyclin, erythromycin, gentamycin. Likewise, the work carried out by **Skowron et al.**, (2019) evaluated the antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from a mixture of frozen vegetables, by the disk diffusion method, followed by evaluation of biofilm formation. In addition, they claim that most of the strains studied were susceptible to antibiotics, but that some were resistant to penicillin, meropenem, erythromycin and cotrimoxazole. Thus, among the strains studied, there was a very weak tendency for the intensity of biofilm formation to decrease, with an increase in their resistance to antibiotics. This means that the emergence of *L. monocytogenes* in food production poses a threat to consumers.

Key words: antibiotic resistant bacteria, food, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, biofilm formation, susceptibility.

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AHL : Acyle-homosérine lactone

AMP : Peptides antimicrobiens

ARN: Acide ribonucléique

BLSE : β -lactamases à spectre étendu

CMB: Concentration minimale bactéricide

CMI: Concentration minimale inhibitrice

DNAe : ADN extracellulaire

EPS: Substances polymériques extracellulaires

ISR: Résistance systémique induite

LPS: Lipopolysaccharide

PBP: Protéines liant les pénicillines

QQ: Quorum Quenching

QS: Quorum Sensing

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

Tableaux cités dans la revue bibliographique

Tableau I: Principaux groupes d'antibiotiques: Classification donnée en fonction de leur mécanisme d'action.....	4
Tableau II: Profil de résistance aux antibiotiques de certaines bactéries lactiques	16

Tableaux cités dans l'article de Kroning et al., 2016

Tableau I: Amorces utilisées pour l'identification des staphylocoques à coagulase positive et des gènes de virulence	32
Tableau II: Caractérisation des souches du groupe d'espèces et des isolats utilisés dans cette étude.....	34
Tableau III: Présence de gènes <i>icaA</i> et <i>icaD</i> , liés à la formation de biofilm et à la présence de gènes d'entérotoxines (A, B, C, D et E) chez <i>S. aureus</i> isolés à partir de bonbons faits à la main.....	37
Tableau IV: Zone moyenne d'inhibition et pourcentage de résistance aux antimicrobiens de <i>S. aureus</i> isolé à partir de bonbons faits à la main	38

Tableaux cités dans l'article de Skowron et al., 2019

Tableau I: Présence de <i>L. monocytogenes</i> dans les légumes surgelés.....	45
Tableau II: Profils de résistance aux antibiotiques des souches étudiées de <i>L. monocytogenes</i> (n=99).....	49
Tableau III: Différences d'intensité de formation de biofilm par les souches étudiées de <i>L. monocytogenes</i> (n=99).....	52

Figures citées dans la revue bibliographique

Figure 1: Mécanisme de transfert horizontal des gènes	7
Figure 2: Nouvelles approches pour contourner les mécanismes de résistance	9
Figure 3: Utilisation des antibiotiques et différentes voies de transmission de la résistance aux antibiotiques dans la chaîne de production alimentaire.....	11
Figure 4: Aperçu schématique du microbiome végétal.....	12
Figure 5: Représentation schématique des étapes de formation du biofilm	18
Figure 6: Le schéma illustre plusieurs aspects : 1: L'effet synergique des molécules du QS dans le développement du biofilm, 2: La transmission de la résistance aux antibiotiques par l'ADN extracellulaire (DNAe) dans la matrice EPS du biofilm. 3: L'effet des antibiotiques sur différentes couches du biofilm. La couche rouge externe représente la population bactérienne sensible aux antibiotiques (indiquée en rouge), tandis que la couche verte interne représente la sous-population résistante aux antibiotiques connue sous le nom de cellules persistantes (indiquée en jaune). 4-: Les molécules d'extinction du quorum (QQ). 5: D'autres stratégies utilisées pour le traitement des biofilms, y compris les peptides antimicrobiens (AMP), les bio-tensioactifs (rhamnolipides),	22

Figures citées dans l'article de Kroning et al., 2016

Figure 1: Produits PCR obtenus avec les amorces nuc 1- nuc 2 (458 pb), nuc 5- nuc 6 (106 pb), nuc 7-nuc 8 (740 pb) et ARNr 16S (252 pb).....	35
Figure 2: Résultats de formation de biofilm (surface PS) pour tous les isolats de <i>S. aureus</i> testés (n=12) cultivés dans du TSB supplémenté avec 1% de glucose à 25°C, pendant 24 h.....	36
Figure 3: Comptages viables d'isolats de <i>S. aureus</i> (n=12) cultivés dans du TSB supplémenté avec 1% de glucose à 25°C pendant 24h.....	37

Figures citées dans l'article de Skowron et al., 2019

Figure 1: Dendrogramme des isolats étudiés de <i>L. monocytogenes</i> (n=100).....	48
Figure 2: Intensité de formation de biofilm par les souches de <i>L. monocytogenes</i> au cours des années individuelles	50
Figure 3: Signification statistique des différences dans la capacité à former un biofilm par les souches de <i>L. monocytogenes</i> isolées au cours des années successives.....	51
Figure 4: Relation entre l'intensité de formation de biofilm et la sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>L. monocytogenes</i>	53

Introduction

Introduction

Au cours des dernières décennies, la mauvaise utilisation des antibiotiques pour la thérapie humaine et la production animale dans le monde ont augmenté la résistance aux antimicrobiens dans divers environnements (**Tiedje et al., 2019**). Il est de plus en plus reconnu que leur utilisation dans l'agriculture et l'aquaculture pourrait contribuer au développement de ce problème, par exemple, les bactéries chez les animaux traités avec des antibiotiques peuvent développer une antibio-résistance (**Tang et al., 2017**), qui pourrait être transmissible à l'homme directement via la chaîne alimentaire, par consommation d'aliments crus ou insuffisamment cuits. De même, par la contamination croisée entre les aliments ou indirectement par l'environnement (**Tang et al., 2017; Bennani et al., 2020**).

La résistance croissante des bactéries aux antibiotiques et les échecs de plus en plus fréquents des traitements contre les infections appellent à l'identification des causes sous-jacentes de ce problème et par conséquent, à la recherche des moyens de le réduire et d'améliorer l'efficacité des thérapies contre les infections (**Kowalska-Krochmal et Dudek-Wicher, 2021**). Beaucoup de bactéries en cause s'avèrent capables de se fixer aux surfaces et de former des biofilms dans un cadre expérimental, notamment par des agents pathogènes comme: *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli entérohémorragique*, *Campylobacter jejuni* et *Staphylococcus aureus*. Cela a conduit à supposer que les biofilms ont un rôle important dans la contamination des produits alimentaires dans les environnements de transformation d'aliments, puisque les usines des transformations alimentaires abritent de nombreux sites propices au développement de biofilms (**Wagner et al., 2020**). Typiquement, les biofilms étant des communautés sessiles de bactéries généralement intégrées dans une matrice polymérique extracellulaire ont montré une résistance considérable aux méthodes de désinfection conventionnelles (**Butt et Khan, 2015; Mathur et al., 2018**).

En règle générale, les biofilms naturels contiennent presque toujours un nombre quantitativement important de différents types d'organismes vivant sous forme de colonie. Les bactéries du biofilm présentent un métabolisme et une expression génique distincts de ceux de leurs homologues planctoniques et présentent un phénotype altéré, avec une tolérance accrue aux mécanismes de défense immunitaire de l'hôte et aux substances

antimicrobiennes administrées de manière exogène (**Guzmán-Soto et al., 2021**). Les mécanismes de résistance des communautés de biofilms ne sont pas similaires à ceux des communautés planctoniques, tels que les mutations du site cible, la perméabilité cellulaire plus faible, les pompes à efflux, les enzymes de modification des antibiotiques, et les protéines neutralisant ces derniers. L'organisation spatiale et la nature multicellulaire du biofilm semblent être le facteur clé de la résistance aux antibiotiques des communautés de biofilm (**Sharma, et al 2019**).

En revanche, vu le manque de stratégies de surveillance et de contrôle efficaces, au niveau des chaînes de production alimentaire, dans les pays en développement ou les sous-développés, principalement pour ce qui est de la propagation des bactéries résistantes et des gènes de résistance aux antibiotiques, ce travail de master a été proposé pour mettre en lumière l'état de la question. En fait, l'objectif principal a été d'explorer l'un des mécanismes sous-jacents impliqué dans la persistance des germes antibio-résistants, qui est compris dans la formation de biofilms, par les bactéries d'origine alimentaire.

Ce mémoire est organisé en deux parties:

La partie bibliographique: composée d'une synthèse générale sur les antibiotiques incluant: mécanisme d'action, et mécanisme de résistance aux antibiotiques, d'une description relative à la présence des bactéries antibio-résistantes dans les aliments et enfin d'une synthèse sur les biofilms: formation, implication dans les mécanismes d'antibio-résistance et impact sur les aliments et la production alimentaire.

La partie présentation d'articles scientifiques: portant sur la lecture attentive et la traduction dans un contexte scientifique de deux articles de recherches liés au thème de ce mémoire; ce qui a permis de connaître et de découvrir les protocoles expérimentaux suivis et de voir l'importance et l'étendue des résultats obtenus, par rapport au danger relatif à la présence dans les aliments de bactéries antibio-résistantes, et surtout persistantes.

L'étude expérimentale prévue n'a pas pu être réalisée, en raison des conditions de travail difficiles quant à la pandémie du Covid-19. Cependant, nous pensons que la revue de littérature présentée et les articles scientifiques traités ont donné une valeur et une tendance scientifique à ce mémoire, tout en attirant l'attention sur la question: de la ferme à l'assiette, sommes-nous en sécurité alimentaire?

Revue Bibliographique

I. Les antibiotiques

1. Définition et activités

Le mot «antibiotique» était à l'origine utilisé en anglais comme adjectif. En 1947, Waksman a publié une définition de l'antibiotique comme nom: un antibiotique est une substance chimique, produite par des microorganismes, qui a la capacité d'inhiber la croissance et même de détruire les bactéries et autres microorganismes (**Bennett, 2015**).

Ces agents antimicrobiens sont des métabolites de faible poids moléculaire (**Bandyopadhyay et Samanta, 2020**), généralement définis comme des substances naturelles, semi-synthétiques ou synthétiques qui peuvent soit tuer ou interférer avec la croissance des bactéries. Une large gamme d'antibiotiques est utilisée pour le traitement des infections bactériennes chez les humains et les animaux, comme additifs alimentaires ou comme promoteurs de croissance chez les animaux, dans les aquacultures et autres activités agricoles (**Founou et al., 2016; Thapa et al., 2020**).

Les antibiotiques sont classiquement regroupés en deux grandes catégories en fonction de leurs effets ou activités *in vitro* sur les bactéries à savoir: bactériostatiques et bactéricides. L'enseignement courant explique souvent que les antibiotiques peuvent être bactéricides, c'est-à-dire tuer les bactéries, ou principalement bactériostatiques, c'est-à-dire inhiber la multiplication des bactéries qui restent viables et peuvent reprendre leur développement lorsque la concentration de l'antibiotique diminue (**Amyes, 2010**). Pour définir avec précision chaque catégorie, la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) doivent être comprises. La CMI représente la plus faible concentration d'un antibiotique donné capable d'interrompre, dans un milieu et à des concentrations parfaitement définies toute croissance visible d'une souche bactérienne donnée après une incubation over-night. Par ailleurs, la CMB représente la plus faible concentration d'antibiotique ne laissant subsister qu'un nombre de survivants inférieur ou égal à 10^4 bactéries de l'inoculum, après 18h de culture à 37°C (**Ferron, 1992; Andrews, 2001**). Il est à noter qu'avec l'action bactériostatique l'inhibition de l'activité est réversible pour une large gamme de concentrations; alors qu'avec l'action bactéricide l'inhibition est irréversible à des concentrations légèrement supérieures à la CMI (**Lancini et al., 1995**). Les CMIs sont considérées comme "l'étalon-or" pour déterminer la sensibilité des organismes aux antimicrobiens (**Andrews, 2001**). En effet, la détermination des valeurs critiques des CMIs vis-à-vis d'un antibiotique permet cliniquement de catégoriser les souches

bactériennes en catégories: sensibles, intermédiaires et résistantes (**Sirot et al., 1996; Gehring et Riviere, 2013**).

2. Mécanismes d'action

Les antibiotiques sont généralement classés selon leur structure moléculaire et leurs mécanismes antimicrobiens (**Becker, 2013; Reygaert, 2018**) (**Tableau I**). Les mécanismes d'action au niveau cellulaire ont permis de catégoriser cinq groupes d'antibiotiques. Les cinq groupes peuvent affecter le métabolisme bactérien et agissent entant que: 1) inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire à effet bactéricide tels que les bêta-lactamines (pénicillines, céphalosproines, carbapénèmes et monobactames) et la vancomycine; 2) inhibiteurs de la synthèse des protéines où les antibiotiques se lient aux sous-unités ribosomiques bactériennes soit les 30S (tels que les tétracyclines et les aminosides (*i.e.* Streptomycine) ou les 50S (macrolides (*i.e.* érythromycine), clindamycine et chloramphénicol); 3) inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques qui se lient à l'ADN-gyrase ou à la topo-isomérase II et interrompent ainsi l'étape de "cassure- et-réunion" de l'ADN (quinolones) ou inhibent l'activité de l'ARN polymérase (rifampicine); 4) inhibiteurs de la voie de biosynthèse du folate (triméthoprime, sulfamides); et 5) inhibiteurs de la fonction de la membrane cellulaire (Polymyxines et Daptomycine) qui affectent la perméabilité cellulaire (**Dowling et al., 2017; Dweba et al., 2018**).

Tableau I: Principaux groupes d'antibiotiques: Classification donnée en fonction de leur mécanisme d'action, adapté d'après **Madigan et al., (2010) et Reygaert, (2018)**.

Mécanisme d'action	Antibiotiques
Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	β-lactames: <i>i.e.</i> Carbapénèmes, Céphalosporines Monobactames et Pénicillines Glycopeptides: <i>i.e.</i> Vancomycine
Dépolarisation de la membrane cellulaire	Lipopeptides: <i>i.e.</i> Daptomycine
Inhibition de la synthèse des protéines	Se liant à la sous-unité ribosomique 30S: Aminoglycosides Tétracyclines Se liant à la sous-unité ribosomique 50S: Chloramphénicol Lincosamides Macrolides Oxazolidinones Streptogramines
Inhibition de la synthèse des acides nucléiques	Quinolones, Fluoroquinolones
Inhibition des voies métaboliques: ex. l'acide folique	Sulfamides, Triméthoprime

3. Résistance aux antibiotiques

Le développement de la résistance aux antimicrobiens peut être considéré comme un problème mondial en écologie microbienne (Levy, 2002; Bottery et al., 2021) et est l'exemple le plus connu d'une adaptation rapide des bactéries à un nouvel écosystème (Carattoli, 2001). La résistance à un antibiotique peut être naturelle ou acquise (Dowling et al., 2017; Reygaert, 2018).

3.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle peut être intrinsèque (toujours exprimée dans l'espèce) ou induite (les gènes sont naturellement présents dans la bactérie, mais ne sont exprimés à des niveaux de résistance qu'après exposition à un antibiotique) (Martinez, 2014; Reygaert, 2018). Elle fait donc référence à l'existence de gènes dans les génomes bactériens qui pourraient générer un phénotype de résistance (Davies et Davies, 2010). La résistance intrinsèque peut être définie comme un trait partagé universellement au sein d'une espèce bactérienne. Elle est indépendante de l'exposition antérieure aux antibiotiques et n'est pas liée au transfert horizontal de gènes (Martinez, 2014; Nadeem et al., 2020).

La résistance intrinsèque chez une espèce individuelle est tout simplement due à l'absence d'une cible sensible d'un antibiotique spécifique; par exemple, le biocide triclosan a une large efficacité contre les bactéries Gram-positif et de nombreuses bactéries Gram-négatif, mais il est incapable d'inhiber la croissance des membres du genre Gram-négatif *Pseudomonas* (Blair et al., 2015).

En général, les mécanismes bactériens les plus courants impliqués dans la résistance intrinsèque comprennent les effets de barrières exercés et qui sont en relation avec la structure de la paroi, en particulier, celle des bactéries Gram négatif, où la perméabilité de la membrane externe est réduite (plus spécifiquement le lipopolysaccharide (LPS)), l'activité naturelle des pompes d'efflux non spécifiques et les enzymes inactivant les antibiotiques (Culyba et al., 2015; Peterson et Kaur, 2018).

3.2. Résistance acquise

La résistance acquise se développe lorsqu'un nouveau caractère est exprimé, généralement due à des modifications génétiques sélectionnées, par l'exposition aux antibiotiques. Les bactéries peuvent également favoriser la résistance aux antibiotiques

indépendamment des changements génétiques, tels que les états persistants ou la formation de biofilm (**Blair et al, 2015**).

Plusieurs mécanismes ont été développés par les bactéries pour acquérir une résistance aux antibiotiques. Tous ces mécanismes nécessitent soit la modification du matériel génétique existant, via des mutations spontanées, soit l'acquisition de nouveau matériel génétique, à partir d'une source étrangère (**Carattoli, 2001; Nadeem et al., 2020**).

Bien que la mutation soit un événement rare, le taux de croissance assez rapide des bactéries et le nombre absolu de cellules atteint favorise l'expression assez rapide de la résistance dans une population cellulaire. En conséquence, la mutation spontanée produite dans le chromosome bactérien, une fois les gènes de résistance sont stabilisés, elle peut être directement transférée à toutes les cellules descendantes, en répliquant l'ADN, un processus connu sous le nom de transfert de gènes à la verticale ou l'évolution verticale (**Coculescu, 2009**).

L'acquisition de matériel génétique qui confère une résistance est possible par: transformation, transduction et conjugaison (toutes appelées transfert horizontal de gènes - HGT) (**Figure 1**). La transformation s'effectue par de l'ADN libre, la transduction par les bactériophages et la conjugaison impliquent des plasmides (**Beceiro et al., 2013**). Les acquisitions peuvent être temporaires ou permanentes. La transmission par les bactériophages est très rare. Par contre, la transmission par conjugaison à médiation plasmidique des gènes de résistance est le moyen le plus courant d'obtenir du matériel génétique externe (**Davies et Davies, 2010; Reygaert, 2018**).

Un même plasmide peut héberger plusieurs gènes, codant pour une multi-résistance aux médicaments (**Carattoli 2013**). Les transposons et les intégrons, liés aux plasmides, accélèrent le développement de la résistance bactérienne en aidant à l'accumulation, l'expression et la dissémination de gènes résistants (**Christie 2016 ; Gupta et Birdi 2017; Nadeem et al., 2020**). Les plasmides porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques bêta-lactames peuvent être diffusés, par conjugaison au niveau intra et interspécifique chez *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. et les espèces d'entérobactéries (**Lerminiaux et Cameron 2019; Nadeem et al., 2020**).

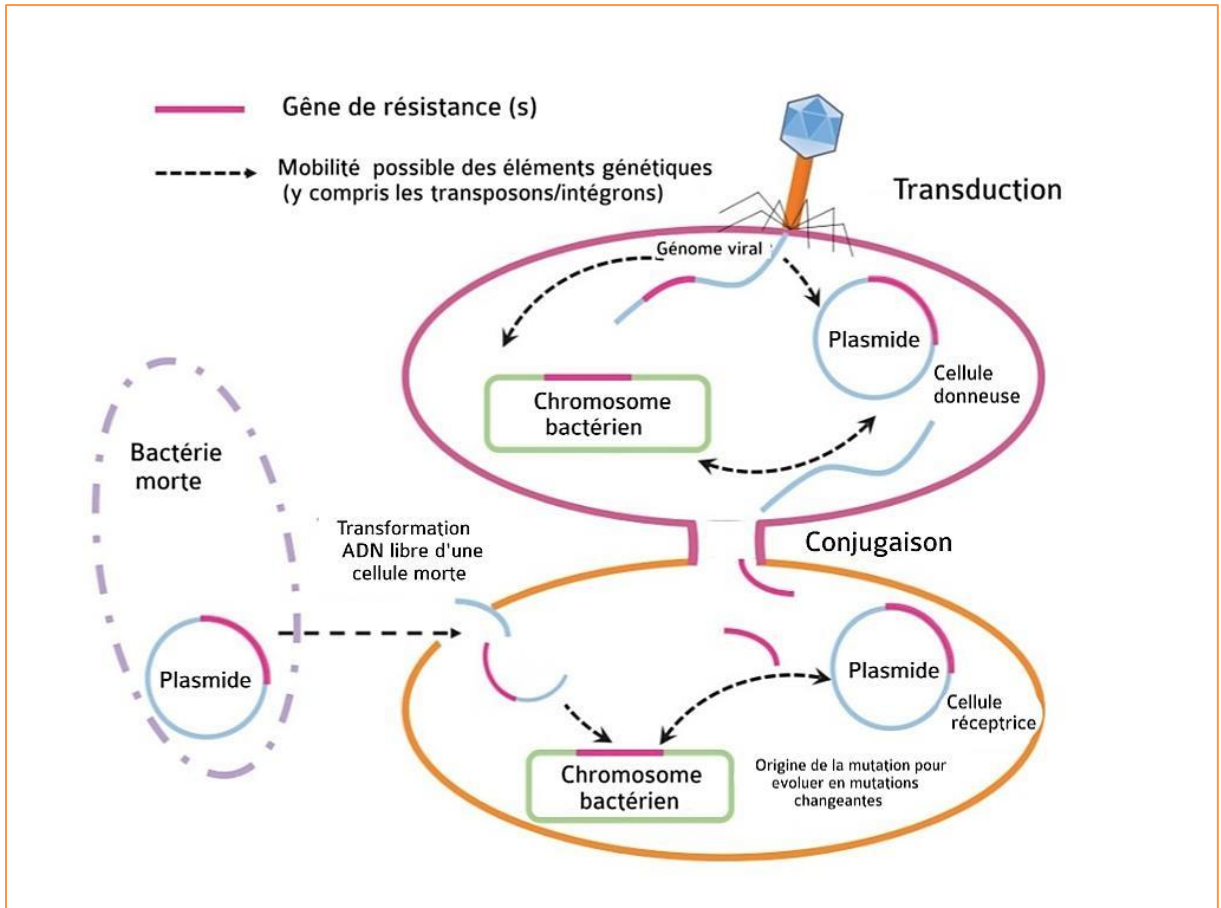


Figure 1. Mécanisme de transfert horizontal des gènes (Nadeem et al., 2020).

La transduction, la conjugaison et la transformation sont les principaux mécanismes par lesquels les bactéries peuvent mobiliser et partager du matériel génétique, avec des espèces apparentées et non apparentées.

3.3. Mécanismes biologiques de la résistance

La résistance aux antibiotiques est un problème clinique mondial de santé publique, en raison de la réduction de l'efficacité causée par les différents mécanismes de résistance (**Munita et Arias, 2016**). Quelle que soit la nature du processus dont la bactérie fait face à un agent antibactérien, la résistance aux antibiotiques survient lorsqu'un gène est capable de s'exprimer et de produire un effet biologique tangible, entraînant la perte d'activité de l'antibiotique (**Alanis 2005; Nadeem et al. 2020**).

De nombreuses stratégies de résistance existent chez les bactéries. Parmi celles-ci, quatre sont fréquemment observées, avec une prévalence élevée chez les isolats cliniques. Ces mécanismes incluent: *(i)* l'inhibition enzymatique des molécules antibiotiques; *(ii)* la diminution de la pénétration des antibiotiques; *(iii)* l'augmentation de l'extrusion d'antibiotiques via des pompes à efflux; et *(iv)* les changements de cibles (**Allen et al., 2010; Nadeem et al., 2020**).

En outre, en raison des différences structurelles (au niveau de la paroi), il existe une variation dans les types de mécanismes utilisés par les bactéries Gram négatif d'une part et les bactéries Gram positif d'autre part (**Reygaert, 2018**). Les bactéries à Gram négatif utilisent pratiquement tous les mécanismes connus (**Figure 2**). Cela inclut l'imperméabilité due à la composition de la membrane externe et à la sélectivité des porines, ainsi que l'augmentation de l'efflux de la cellule (**Impey et al., 2020**). En revanche, le mécanisme de résistance des bactéries à Gram positif peut se produire à travers deux stratégies majeures: la dégradation enzymatique de l'antibiotique par la production de β -lactamases, ou en diminuant l'affinité et la sensibilité de leur site cible (ex. les protéines liant les pénicillines (PBP) (**Jubeh et al., 2020**).

En général, la présence de divers composés et conditions potentiellement offensants dans la nature pourrait sélectionner des mécanismes spécifiques ou non spécifiques de résistance aux antibiotiques. De plus, certains gènes confèrent une résistance aux antibiotiques, mais sont susceptibles d'avoir d'autres rôles primaires dans l'environnement (**Piepersberg et al., 1988; Allen et al., 2010**). Certaines classes de pompes à efflux, par exemple, offrent des mécanismes généraux de résistance, car elles pompent diverses toxines, telles que les métaux lourds et autres molécules toxiques, hors des cellules (**Poole, 2005; Allen et al., 2010**).

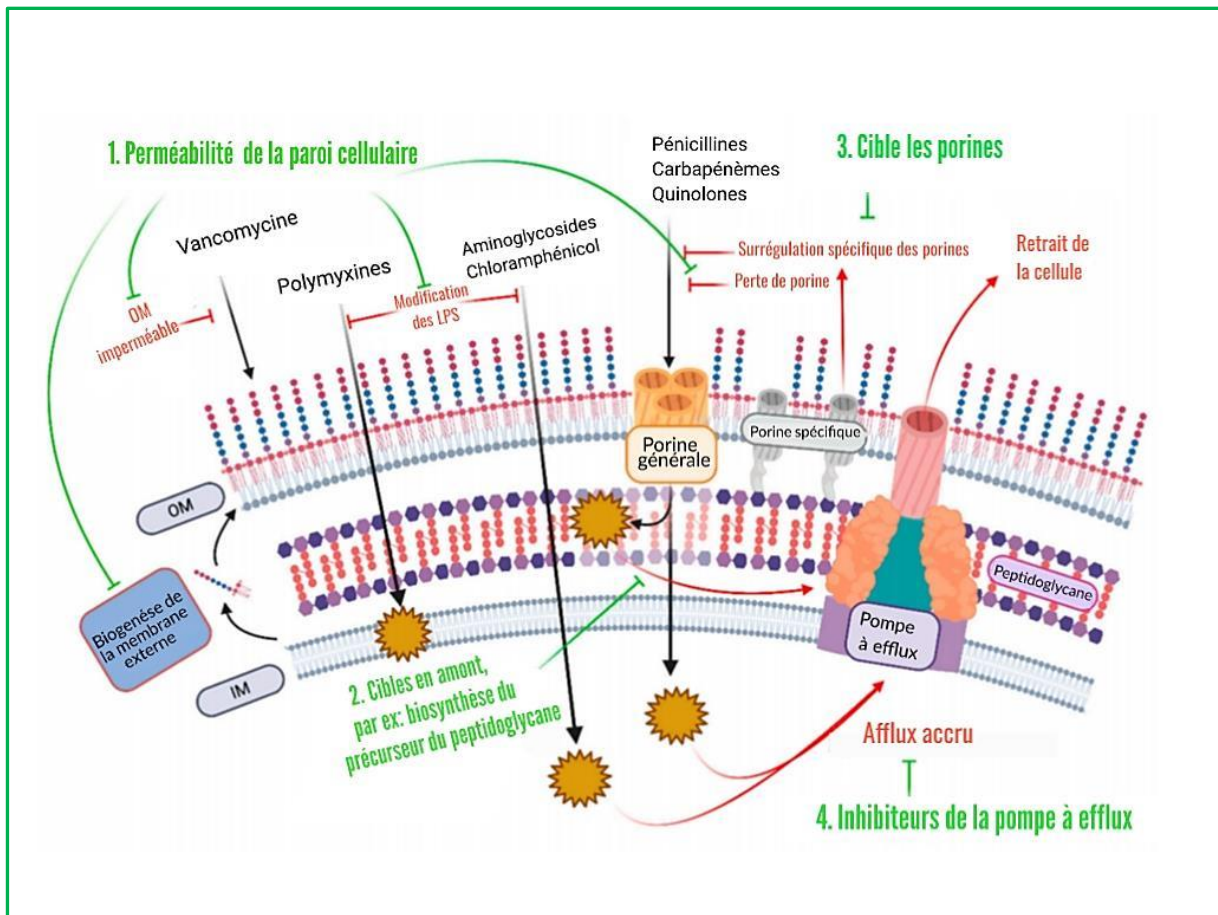


Figure 2. Nouvelles approches pour contourner les mécanismes de résistance (Impey et al., 2020).

En vert, les approches potentielles pour surmonter les mécanismes de résistance aux antibiotiques associés à la paroi cellulaire des bactéries Gram-négatif. (1) La première approche consiste à utiliser des composés pour perturber et perméabiliser la paroi cellulaire, notamment en ce qui concerne la biogenèse et le transport de la membrane externe ou en utilisant des composés de polymyxine qui augmentent la sensibilité aux antibiotiques actuels. (2) Les cibles en amont de la couche de peptidoglycane, telles que la biosynthèse de précurseurs de peptidoglycane, représentent de nouveaux modes d'action potentiels susceptibles de contourner les mécanismes de résistance préexistants. (3) L'inhibition de la porine est une cible antibiotique intéressante, qui peut réduire la virulence bactérienne, aidant ainsi à éliminer l'infection par le système immunitaire. (4) Comme presque toutes les classes d'antibiotiques sont sensibles à l'efflux, les inhibiteurs de la pompe à efflux visent à bloquer l'extrusion des antibiotiques, augmentant ainsi leur concentration active dans la cellule.

II. Résistance aux antibiotiques dans un contexte alimentaire

1. Aperçu général

Les principales questions liées à la résistance aux antimicrobiens sont les infections nosocomiales et la propagation de la résistance par les animaux et/ou l'environnement, entre autres la chaîne de production alimentaire (**Venter et al., 2017**). Pour ce qui est des infections nosocomiales, il est bien connu que ce type d'infection qui affecte des patients hospitalisés est causé par des bactéries opportunistes, beaucoup d'entre elles sont multi-résistantes. Un premier exemple notable est celui des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) et le second concerne celui d'*Enterococcus* résistant à la vancomycine (**Struelens, 1998; Spelman, 2002; Pettigrew et al., 2016; Wang et al., 2019**). Le risque d'infections nosocomiales dépend des pratiques de contrôle des infections dans l'établissement hospitalier, de l'état immunitaire du patient et de la prévalence des divers agents pathogènes au sein de la communauté. Les facteurs de risque pour les infections nosocomiales incluent: l'immunosuppression, l'âge avancé, la durée du séjour à l'hôpital, les comorbidités sous-jacentes multiples, les visites fréquentes dans les établissements de santé, l'assistance ventilatoire mécanique, les procédures invasives récentes, les dispositifs à demeure (perfuseur, aiguille épicroânienne, sonde etc.) et le séjour dans une unité de soins intensifs (**Monegro et al., 2017**).

En revanche, dans cet aperçu bibliographique, l'attention est portée sur la résistance aux antibiotiques dans un contexte alimentaire. Dans la production alimentaire, les antibiotiques trouvent différentes utilisations (**Bandyopadhyay et Samanta, 2020**). Les animaux sont traités avec des antibiotiques pour à la fois guérir les maladies et favoriser la croissance (**Aarestrup, 2005; Chattopadhyay, 2014**). Les arbres fruitiers sont souvent traités de manière prophylactique avec des antibiotiques pour contrôler les infections bactériennes (**McManus et al., 2002; Stockwell et Duffy, 2012**) et l'aquaculture repose aussi sur des antibiotiques, pour gérer les maladies infectieuses (**Cabello, 2006; Allen et al., 2010**).

Dans chacune de ces situations, les effets des antibiotiques s'étendent au-delà du site d'utilisation. Les antibiotiques appliqués dans les exploitations d'élevage s'infiltrent dans les cours d'eau et les eaux souterraines; dans de nombreux milieux aquacoles, les antibiotiques se diffusent dans l'eau entourant les enclos. Les antibiotiques pulvérisés sur les plantes peuvent aussi dériver par voie aérienne (**Allen et al., 2010; Founou et al., 2016**). Cette situation relative aux rejets des antibiotiques dans l'environnement est à l'origine d'une

exposition répétée des bactéries pathogènes et non pathogènes (commensales) aux antibiotiques; ce qui a favorisé l'émergence du phénomène de la résistance aux antibiotiques (Pana, 2012; Le Page et al., 2017; Peterson et Kaur, 2018). En réalité, l'émergence de la résistance est un processus très complexe qui n'est pas encore pleinement compris, en ce qui concerne l'importance de l'interaction des populations bactériennes et les antibiotiques, même dans un environnement médical (Pana, 2012). Il est clair que les bactéries antibio-résistantes et les gènes de résistance aux antibiotiques, appelés aussi résistome, peuvent facilement se propager à chaque étape de la chaîne de production alimentaire. Les bactéries antibio-résistantes peuvent atteindre les humains tout au long de la chaîne alimentaire soit, par la consommation d'aliments contaminés, ou à la suite d'un contact direct avec des animaux colonisés/infectés ou des substances biologiques telles que le sang, l'urine, les matières fécales, la salive, et le sperme entre autres (Figure 3) (Chang et al., 2015; Founou et al., 2016; Venter et al., 2017). Par exemple, l'utilisation prophylactique d'antimicrobiens chez les poulets d'élevage industriel est énorme, elle a été estimée à une consommation annuelle mondiale de 148 mg d'antibiotique par kg d'animal produit (Van Boeckel et al., 2015). Des incidents comme ceux-ci ont suscité de nombreux appels publics à une « viande sans antibiotiques » (Venter et al., 2017).

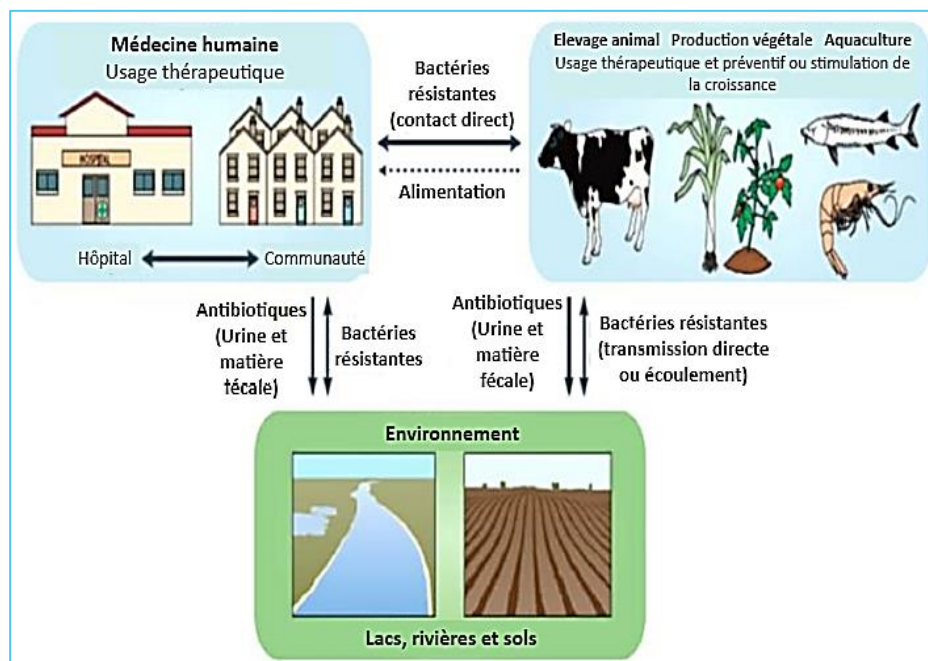


Figure 3. Utilisation des antibiotiques et différentes voies de transmission de la résistance aux antibiotiques dans la chaîne de production alimentaire (Founou et al., 2016).

Cependant, ce ne sont pas les antibiotiques résiduels dans la viande qui posent problème, le vrai problème est la sélection de super bactéries multi-résistantes chez les animaux élevés sous antimicrobiens. Ces animaux pourraient agir comme des réservoirs d'organismes résistants qui pourraient éventuellement trouver leur chemin vers les consommateurs humains, soit par l'environnement, soit par contact direct (Aarestrup et al., 2008; Venter et al., 2017).

Par ailleurs, le microbiome végétal représente aussi une voie majeure, par laquelle l'homme est exposé à des bactéries résistantes aux antibiotiques et à des gènes de résistance naturellement présents dans l'environnement (Figure 4) (Chen et al., 2019).

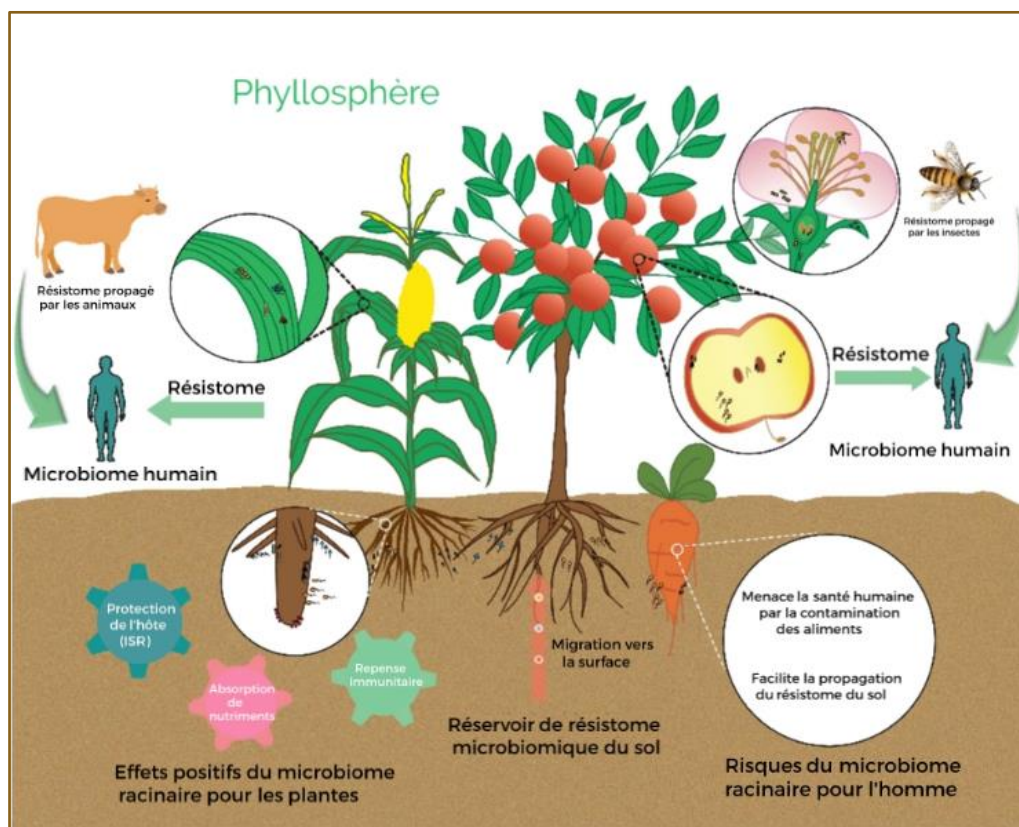


Figure 4. Aperçu schématique du microbiome végétal (Chen et al., 2019).

Les composantes (parties) aériennes des plantes, collectivement connues sous le nom de phyllosphère, représentent un habitat intrinsèquement ouvert et variable dominé par les feuilles. Les résistomes antibiotiques associés à la phyllosphère peuvent influencer les microbiomes humains par consommation et contact directs, ou à travers la chaîne alimentaire. Les composantes souterraines des plantes, en particulier la zone étroite du sol entourant les racines des plantes, sont collectivement connus sous le nom de rhizosphère, qui contient de nombreux microorganismes. Le microbiome rhizosphérique permet à la plante l'acquisition des nutriments, la tolérance au stress abiotique et la protection contre les virus et autres agents pathogènes, via la résistance systémique induite (ISR) et l'activation du système immunitaire de la plante, en réponse à l'attaque pathogène foliaire (réponse immunitaire). Cependant, le microbiome rhizosphérique facilite également la propagation des résistomes antibiotiques et met la santé humaine en danger à cause des aliments contaminés.

2. Présence des bactéries antibio-résistantes dans les aliments

Plusieurs épidémies de maladies infectieuses causées par des organismes multi-résistants, acquis par des sources alimentaires ont attiré l'attention du public sur la question de l'utilisation des antibiotiques en agriculture (Venter et al., 2017). De même, des données récentes viennent de confirmer la retombée négative de la surutilisation des antibiotiques dans la production animale, en rapportant des chiffres alarmant et des niveaux élevés de la résistance aux antibiotiques d'isolats bactériens provenant d'animaux malades (Haulisah et al., 2021; Balemi et al., 2021).

Ainsi, de nombreux rapports ont décrit la présence de bactéries antibio-résistantes dans divers produits alimentaires (viande prête à consommer, viande cuite, et lait en vrac); provenant de diverses sources animales, telles que les bovins, volaille, chèvre et mouton, et à différents stades de la chaîne de production alimentaire. Cette présence concerne aussi des produits végétaux tels que les fruits et légumes (Verraes et al., 2013; Venter et al., 2017; Lin et al., 2019; Adzitey et al., 2019; Bandyopadhyay et Samanta, 2020). Ces derniers, consommés frais, sont récemment devenus de plus en plus reconnus comme vecteurs potentiels de maladies d'origine alimentaire. Dans de nombreux pays, plusieurs épidémies ont été associées à la consommation de fruits et légumes frais contaminés, tels que les germes de graines de fenugrec contaminés par *Escherichia* et les tomates et les épinards contaminés par *Salmonella* et *E. coli* (Zekar et al., 2017).

D'autres aliments sont exposés durant leur parcours dans la chaîne alimentaire à divers microorganismes pathogènes, tels les salades prêtes à consommer. Ils peuvent alors faire l'objet d'un certain degré de transformation technologique minimale, avant la distribution commerciale (Teban et al., 2013).

Différentes espèces bactériennes résistantes aux antibiotiques colonisant et/ou infectant et contaminant des animaux ainsi que des aliments ont été décrites dans la littérature. Par exemple, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) (Price et al., 2012), *Campylobacter* (Ewnetu et Mihret, 2010) et des entérobactéries qui produisent des β -lactamases à spectre étendu (BLSE), à savoir: *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Escherichia coli*, et *Klebsiella* spp (Fischer et al., 2012; Al Bayssari et al., 2015).

Quelques exemples de bactéries antibio-résistantes d'origine alimentaire sont cités ci-après:

2.1. *Escherichia coli*

Cette espèce d'enterobacteriaceae est l'une des plus utilisée par les chercheurs pour déterminer la résistance aux antibiotiques, car *E. coli* existe dans le tractus humain et animal et dans l'environnement. Par conséquent, il n'est pas surprenant que certaines *E. coli* présentes dans l'environnement réinfectent les humains par le biais d'aliments d'origine végétale ou animale (Li et al., 2020).

De nombreuses études ont signalé la contamination des viandes rouges et blanches par *E. coli*, avec un profil d'antibio-résistance (Altalhi et al., 2010; Álvarez-Fernández et al., 2013; Dsani et al., 2020; González-Gutiérrez et al., 2020). Dsani et al., (2020) ont trouvé une contamination par *E. coli* dans 48% des échantillons de viande étudiés, avec une multi-résistance observée dans 22% des isolats. Par ailleurs, González-Gutiérrez et al., (2020) ont observé des taux de résistance élevés pour deux antimicrobiens largement utilisés dans les élevages bovins (céfalotine et tétracycline) chez des souches d'*E. coli* isolées à partir de préparations de bœuf cru du nord-ouest de l'Espagne.

D'autres rapports ont rapporté sur la présence d'*E. coli* dans des aliments vendus au détail (Li et al., 2020) ou des préparations d'aliments prêts à consommer, par exemple, Abass et al., (2020) ont montré que des échantillons de viandes prêtes à consommer étaient des sources d'isolats d'*E. coli* résistants aux antibiotiques utilisés par les agriculteurs.

2.2. *Salmonella*

La salmonelle est l'un des agents pathogènes d'origine alimentaire les plus courants, provoquant des épidémies de maladies d'origine alimentaire dans le monde (Newell et al., 2010). Ainsi, une grande partie des *salmonelles* résistantes aux antibiotiques ont été acquises par la consommation d'aliments d'origine animale contaminés, ce qui entraîne un risque pour la santé des humains et augmente le coût des soins de santé (Castro-Vargas et al., 2020). D'ailleurs des études ont signalé le profils de virulence et de résistance aux antimicrobiens des sérotypes de *Salmonella enterica* isolés de poulet sur des marchés humides à Dhaka, Bangladesh (Siddiky et al., 2021). Plusieurs chercheurs ont signalé aussi des taux de prévalence variables d'infection à *Salmonella* dans les sources d'alimentation animale (à partir d'échantillons d'élevages de poulets de chair) au Bangladesh (Alam et al., 2020; Mridha et al., 2020). De même, d'autres études ont évalué la présence

des *Salmonella* dans les salades prêtes à consommer et ont aussi caractériser la résistance aux antibiotiques des isolats de *S. enterica* (Taban et al., 2013).

Gupta et al., (2019) ont trouvé dans le porc tous les gènes de résistances aux antibiotiques et leur organisation dans un ensemble de *Salmonella*.

2.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est un agent pathogène opportuniste qui fait partie de la flore commensale normale des humains et du bétail, colonisant environ 30 % à 50 % de la population humaine, et est considéré comme l'espèce la plus importante sur le plan clinique (Dweba et al., 2018). De même, *S. aureus* est impliqué dans d'innombrables cas et épidémies d'intoxications alimentaires dans le monde (Lira et al., 2016). Cette espèce de coques à Gram-positif est connue pour sa capacité à devenir résistante aux antibiotiques, notamment à la méthicilline (SARM) (Foster, 2017; De Oliveira et al., 2020). Des études ont signalé la prévalence des gènes de virulence et de résistance aux antimicrobiens dans des échantillons de poulet d'Afrique du Sud ainsi que des importations en provenance du Brésil et des isolats cliniques humains (Zishiri et al., 2016).

Lira et al., (2016) ont montré la contamination des petites usines de lait de chèvre par *S. aureus* et sa capacité à former un biofilm, avec un profil d'antibio-résistance. D'ailleurs, parmi les antibiotiques les plus utiles dans le traitement des infections causées par *S. aureus* figurent les β -lactamines entre autres, la pénicilline, la méthicilline, la flucloxacilline, la dicloxacilline, la nafcilline, l'oxacilline et la cloxacilline (da Silva et al., 2020).

2.4. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont de membres d'un groupe hétérogène de bactéries jouant un rôle important dans une variété de processus de fermentation (Bintsis, 2018). Les genres fréquemment rencontrés dans la fermentation alimentaire sont: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Weissella* (Mokoena, 2017; Wang et al., 2021). La plupart des souches appartenant au genre *Lactobacillus* ont des propriétés bénéfiques pour la santé et sont donc recherchées pour leur utilisation comme compléments alimentaires (Zhang et al., 2018). Certaines espèces lactiques ont été rapportées résistantes à quelques antibiotiques (Tableau II). Les entérocoques constituent le groupe de bactéries le plus prédominant présent dans les

aliments, ils sont responsables d'importantes d'infections nosocomiales et trouvés résistants à la vancomycine (De Oliveira et al., 2020). Des études ont rapporté une présence d'entérocoques dans des fruits de mer, cette contamination se produisait naturellement dans un environnement où les poissons sont habituellement collectés (Igbiosa et Beshiru, 2019). Par ailleurs, Chajeka-Wierzchowska et al. (2016) ont trouvé que les entérocoques sont largement présents dans la viande ou les produits de viande prêts-à-consommer vendus au détail, où de nombreuses souches isolées appartenant aux espèces *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* et *E. hirae* sont trouvées résistantes aux antibiotiques et hébergeant des déterminants de résistance échangeables et transférables. Les entérocoques sont en effet, intrinsèquement résistants ou tolérants à de nombreux antimicrobiens et acquièrent facilement une résistance de haut niveau, par transfert horizontal de gènes. Golob et al., (2019) ont rapporté que la résistance naturelle d'*E. faecalis* et *E. faecium* comprend les céphalosporines, les aminosides (résistance de faible niveau), les macrolides et les sulfamides, ainsi que la clindamycine et la quinupristine/dalfopristine chez *E. faecalis*. De plus, les entérocoques montrent un potentiel de résistance à pratiquement à tous les antimicrobiens utilisés dans les infections humaines (Hollenbeck et Rice, 2012; Xiong et al., 2021).

Tableau II: Profil de résistance aux antibiotiques de certaines bactéries lactiques (Moračanin et al., 2017).

Espèce lactique	Sensibilité intrinsèque aux antibiotiques	Résistance intrinsèques aux antibiotiques
<i>Bifidobacterium</i>	Ampicilline, pénicilline G, bacitracine, céphalosporine, chloramphénicol, érythromycine, clindamycine, nitrofurantoïne, tétracycline	Vancomycine, gentamicine, acide fusidique, streptomycine, polymyxine B, triméthoprim, aminosides, colistine, métronidazole
<i>Lactococcus lactis</i>	Amikacine, ampicilline, 1ère génération céphalosporine, chloramphénicol, érythromycine, gentamicine, pénicilline, imipénem, oxacilline, sulfamide, tétracycline, vancomycine	Colistine, fosfomycine, acide pipémidique, rifamycine
<i>Lactobacillus</i> spp.	Chloramphenicol, streptomycine, gentamycin, penicilline G, tétracycline, érythromycine	Aminoglycosides, fluoroquinolones, glycopeptides, vancomycine

III. Les Biofilms

1. Signaux et communications cellulaires

Les bactéries adoptent le quorum sensing (QS) comme moyen de communiquer par l'intermédiaire de molécules de signalisation chimiques appelées auto-inducteurs, dont la concentration externe augmente en fonction de l'augmentation de la densité de la population cellulaire, afin de coordonner et de coopérer pour la prolifération (**Reading et Sperandio, 2006; Saxena et al., 2018**). Une fois qu'une concentration seuil est atteinte, le signal interagit avec une protéine réceptrice, provoquant un changement coordonné de l'expression des gènes dans la population. Les bactéries y synchronisent des comportements particuliers et fonctionnent ainsi comme des organismes multicellulaires. Plusieurs types de signaux QS existent: de nombreuses protéobactéries utilisent des signaux de type acyl-homosérine lactone (AHL), et les espèces Gram-positif utilisent des signaux oligopeptidiques courts qui sont souvent chimiquement modifiés (**Waters et Bassler, 2005; Abisado et al., 2018**).

Des mécanismes existants peuvent bloquer la communication entre les bactéries, par l'inhibition du QS. Ce mécanisme est appelé le quorum quenching (QQ) (**Mion et al., 2019**). Le QQ consiste en la dégradation enzymatique des molécules signal du système QS afin d'éviter leur accumulation dans l'environnement et d'inhiber la modification de l'expression des gènes, ce qui perturberait la communication microbienne. Les molécules conductrices de QQ peuvent réduire, voire inhiber complètement la production de facteurs de virulence y compris la formation de biofilm (**Paluch et al., 2020**). Le QS a un rôle très important dans la formation de biofilms. Les bactéries peuvent alors s'organiser en groupes, former des communautés bien organisées et communiquer pour des activités coordonnées et une vie sociale (**Alav et al., 2018**).

2. Définition du biofilm

Le biofilm est un mode de vie adopté par les microorganismes, avec un large éventail d'adaptations physiologiques et morphologiques, en réponse aux conditions de stress environnemental (**Scheie et Petersen, 2004**). Autrement, le biofilm est défini comme une communauté complexe de microorganismes immobiles constituée par une ou plusieurs espèces immergées dans une matrice extracellulaire de compositions différentes, selon le type d'environnement (nutriments) et les espèces colonisatrices qui peuvent être trouvées

attachées à une surface (Galié et al., 2018; Roy et al., 2018; Sharma et al., 2019). Ces surfaces sont rencontrées dans les environnements alimentaires, médicaux, industriels et naturels (Abebe, 2020).

Les biofilms isolés de différents environnements partagent des caractéristiques communes, ils sont constitués de cellules bactériennes, de substances polymériques extracellulaires (EPS) auto-générées et d'une grande quantité d'eau. L'EPS peut être composé d'une large gamme de polymères organiques, notamment des polysaccharides, des protéines et de l'ADN extracellulaire, et forme des cadres solides et collants, pour servir de « maisons des cellules du biofilm » (Flemming et al., 2007; Yang et al., 2011).

3. Étapes de formation du biofilm

Selon leur phase de croissance, les microorganismes peuvent être divisés en deux groupes: planctonique ou sessile. Au stade planctonique, les microorganismes vivent comme des organismes flottants libres individuels, tandis que dans la phase sessile, ils sont attachés à une surface, formant un biofilm et fonctionnent comme une communauté étroitement intégrée (Poulsen, 1999). Les biofilms représentent un environnement dynamique et complexe). Leur formation se fait en plusieurs étapes (Figure 5) (généralement cyclique) (Mizan et al., 2015).

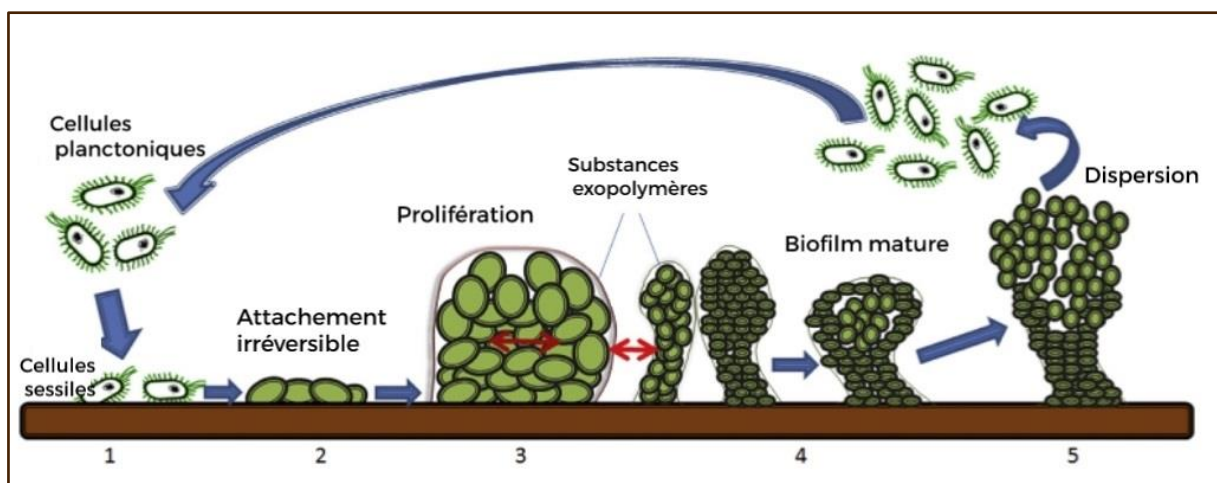


Figure 5. Représentation schématique des étapes de formation du biofilm. La formation de biofilm implique 5 étapes : **(1)** attachement initial, **(2)** attachement irréversible, **(3)** développement de micro-colonies par prolifération, **(4)** formation de biofilm et **(5)** dispersion (Mizan et al 2015).

3.1. Attachement initial ou réversible

L'attachement à une surface représente un tournant entre la vie planctonique et le mode biofilm (**Toyofuku et al., 2016**). Initialement, les cellules bactériennes s'adsorbent sur un substrat par le biais d'interactions non spécifiques dans les surfaces abiotiques ou biotiques. Celles-ci impliquent une série d'interactions physico-chimiques attractives et répulsives entre les bactéries et la surface, où les forces de Lifshitz-van der Waals, les interactions électrostatiques et les forces hydrophobes acide-base de Lewis sont les premières à participer (**Ren et al., 2018; Guzmán-Soto et al., 2021**). Lors de l'interception de la surface, l'adhérence est médiée par des appendices adhésifs extracellulaires supplémentaires et des adhésines sécrétées. Cependant, la décision de « coller » n'est pas absolue; l'attachement initial est dynamique et réversible, au cours duquel les bactéries peuvent se détacher et rejoindre la population planctonique, si elles sont perturbées par des forces hydrodynamiques (détachement des bactéries de la surface), des forces répulsives ou en réponse à la disponibilité des nutriments (**Kostakioti et al., 2013**). Dans l'attachement initial, les motilités médiées par les flagelles et les pili de type IV sont importantes. Les flagelles et les pili sont deux familles d'appendices bactériens qui jouent des rôles essentiels lors des interactions initiales avec la surface cible (**Rabin et al., 2015; Guzmán-Soto et al., 2021**).

3.2. Attachement irréversible

La fixation irréversible est obtenue par des bactéries qui peuvent résister aux forces de cisaillement et maintenir une adhérence constante sur la surface (**Kostakioti et al., 2013**). Aussi, la participation d'appendices bactériens peut être observée tout au long des étapes de développement du biofilm. Il a été rapporté que l'interaction entre la rotation du pili et du flagelle encourage la transition d'un attachement bactérien temporel vers un état stable, souvent appelé « irréversible » (**Guzmán-Soto et al., 2021**).

3.3. Formation de micro-colonies

Après une fixation irréversible, les cellules s'agglutinent et se multiplient et commencent à produire des composants de la matrice de biofilm, formant de petits agrégats de bactéries appelés "micro-colonies" (**Armbruster et Parsek, 2018**). Lors de cette étape, les bactéries sécrètent donc la matrice de substances polymériques extracellulaires (mentionnée ci-dessus), qui contribue de différentes manières au développement du biofilm, étant

particulièrement importante pour la formation de micro-colonies où elle sert de support structurel, en remplissant l'espace entre les cellules et en les recouvrant partout. Par conséquent, la matrice du biofilm aide à l'arrangement multicouche des cellules bactériennes, agissant comme une interphase avec le microenvironnement environnant **(Guzmán-Soto et al., 2021)**.

3.4. Maturation du biofilm

Le développement du biofilm est un comportement de groupe coopératif médié par des signaux chimiques dépendant de la densité cellulaire, libérés par des populations bactériennes intégrées dans une matrice du biofilm **(Solano et al., 2014)**. Le QS est alors utilisé pour communiquer et orchestrer les comportements de groupe, y compris la sécrétion de facteur de virulence et la formation de biofilm **(Kim et al., 2017; Scoffone et al., 2019)**. La détection du QS active la maturation et le désassemblage du biofilm de manière coordonnée **(Solano et al., 2014)**. Après la formation des micro-colonies, la prolifération cellulaire et l'agrégation des bactéries continuent d'augmenter, avec la synthèse de la matrice du biofilm, jusqu'à atteindre une densité cellulaire optimale, telle que régulée par le QS. Les micro-colonies se développent pour donner des structures, dont la morphologie varie de macro-colonies en forme de champignon à des couches uniformes et épaisses de bactéries **(Yang et al., 2011; Ha et O'Toole, 2015)**. La plupart des biofilms s'organisent en communautés multi-espèces, où chaque microorganisme influence la morphologie et l'architecture du biofilm résultant; qui peuvent être différents du biofilm mono-espèce **(Guzmán-Soto et al., 2021)**.

3.5. Dispersion

La dernière étape de la formation de biofilm est le détachement et la dispersion des cellules bactériennes **(Tremblay et al., 2014)**. La membrane la plus externe est habitée par du plancton, qui peut flotter librement vers d'autres zones et former un nouveau biofilm sous des conditions particulières **(Zhao et al., 2017)**. La libération de la forme planctonique du biofilm peut se faire de deux manières, les bactéries peuvent se détacher de façon continue, en petite quantités (l'érosion du biofilm) et aussi un détachement massif rapide, en fragment, de quantités importantes de bactéries **(Abebe, 2020)**. A ce stade, les cellules microbiennes régulent positivement l'expression des protéines liées à la formation des

flagelles, pour permettre aux bactéries de se déplacer vers un nouveau site. Le détachement des cellules microbiennes et le transfert vers un nouveau site contribuent à la propagation des infections, il est donc important d'étudier le mécanisme de détachement du biofilm et son inhibition pour prévenir l'infection par les agents pathogènes d'origine alimentaire **(Muhsin et al 2017)**.

4. Biofilms et la résistance aux antibiotiques

4.1. Aspects généraux

Le biofilm représente un microenvironnement hétérogène **(Wimpenny et al., 2000; Ren et al., 2018)**, là où plusieurs acteurs moléculaires interviennent, notamment ceux impliqués dans la résistance aux antibiotiques **(Figure 6) (Saxena et al., 2018)**. Les cellules bactériennes dans un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants, elles sont 10 à 1 000 fois moins sensibles aux agents antimicrobiens spécifiques que les cellules planctoniques **(Gilbert et al., 2002; Alav et al., 2018)**. Cette sensibilité réduite est causée majoritairement par une combinaison de trois différents facteurs. Le premier concerne la mauvaise pénétration des antibiotiques dans la matrice polysaccharidique. Le deuxième pourrait impliquer la présence arbitraire de sous-populations de phénotypes résistants dans le biofilm, appelées «persistantes», les rendant plus résistants aux traitements d'antibiotiques, et enfin un troisième facteur très important, qui est la présence de cellules non en croissance (dormante) ou de cellules qui ont déclenché des réponses au stress dans des conditions chimiques défavorables, au sein de la matrice du biofilm **(Donlan et Costerton, 2002; Balcázar et al., 2015)**.

Par ailleurs, le métabolisme des bactéries d'un biofilm joue également un rôle très important dans sa résistance **(Tremblay et al., 2014)**. Les bactéries du biofilm développent un phénotype métabolique altéré. Au fur et à mesure que les bactéries continuent de se diviser dans le biofilm, les nutriments locaux s'épuisent et des stratégies de survie supplémentaires sont déployées, certaines bactéries du biofilm subissent des changements phénotypiques ou génotypiques qui réduisent considérablement leurs besoins métaboliques **(Muthukrishnan et al., 2019)**, notamment envers l'oxygène. En effet, certains modèles mathématiques ont prédit, avec précision que la susceptibilité serait réduite dans les biofilms plus épais, en raison de la limitation de l'oxygène **(Stewart, 1994; Gilbert et al., 2002)**.

Souvent localisées dans la partie interne du biofilm, les bactéries moins actives sont également moins sensibles à de nombreux antibiotiques (Lamret et al., 2020), ces derniers attaquent les bactéries en division active et ciblent le métabolisme en croissance (Muthukrishnan et al., 2019). Il a également été montré que l'arrangement spatial étroit des différentes espèces bactériennes peut être avantageux pour la communauté dans son ensemble (Wimpenny et al., 2000), y compris dans la résistance aux antibiotiques (Estrela et Brown, 2018).

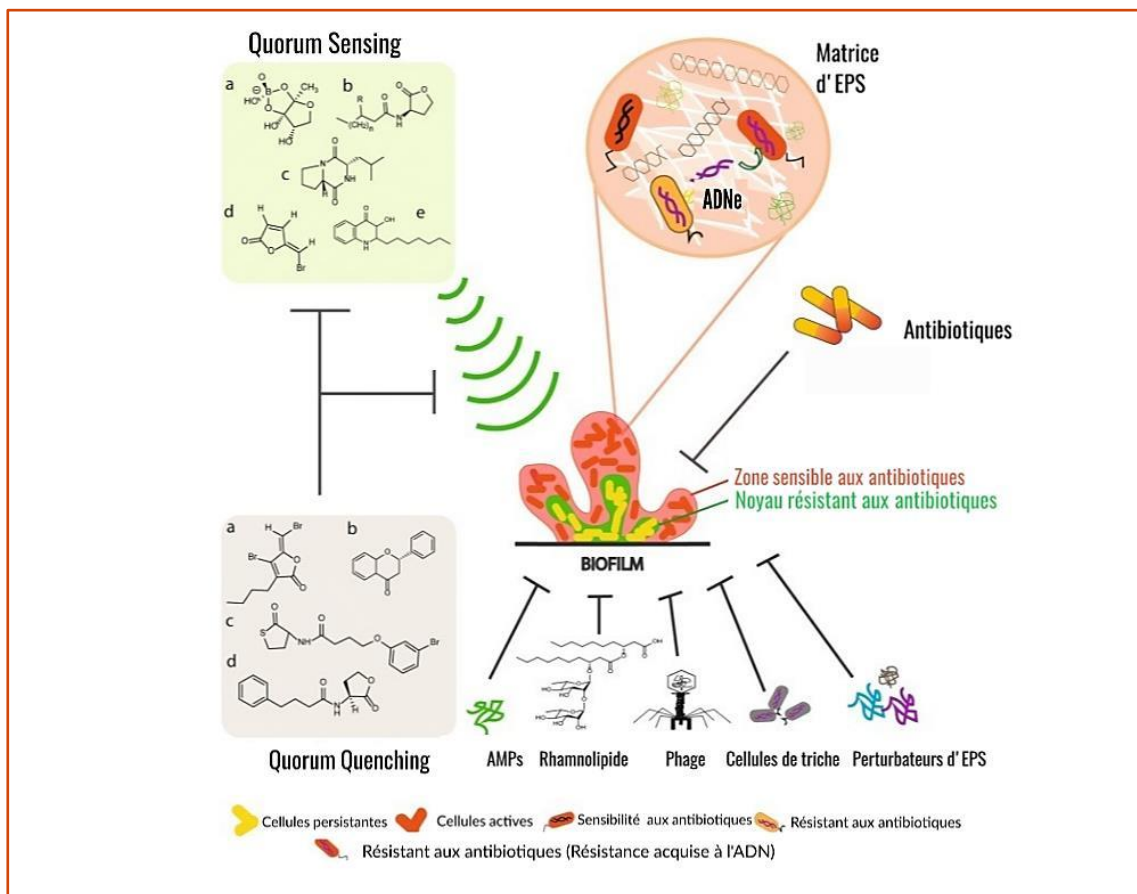


Figure 6 : Le schéma illustre plusieurs aspects: 1-: L'effet synergique des molécules du QS dans le développement du biofilm, 2-: La transmission de la résistance aux antibiotiques par l'ADN extracellulaire (DNAe) dans la matrice EPS du biofilm. 3-: L'effet des antibiotiques sur différentes couches du biofilm. La couche rouge externe représente la population bactérienne sensible aux antibiotiques (indiquée en rouge), tandis que la couche verte interne représente la sous-population résistante aux antibiotiques connue sous le nom de cellules persistantes (indiquée en jaune). 4-: Les molécules d'extinction du quorum (QQ). 5-: D'autres stratégies utilisées pour le traitement des biofilms, y compris les peptides antimicrobiens (AMP), les bio-tensioactifs (rhamnolipides), les particules de phage, les cellules de triche et différentes enzymes perturbant l'EPS sont illustrées par des flèches de bloc (Saxena et al., 2018).

4.2. Aspects sous-jacents de la résistance

Les mécanismes moléculaires sous-jacents liés à la résistance des biofilms aux antibiotiques peuvent être en relation avec d'autres paramètres incluant, les voies impliquées dans la protection contre le stress oxydatif, l'expression des pompes d'efflux et la barrière protectrice fournie par les composants de l'EPS (**Alav et al., 2018; Saxena et al., 2018**). Par exemple, chez *Pseudomonas aeruginosa*, il a été montré que les composants exopolysaccharidiques de la matrice du biofilm, tels que l'alginate, le Pel et le Psl, jouent un rôle dans la tolérance aux antimicrobiens, lorsque les bactéries se développent sous forme d'agrégats (**Goltermann et Tolker-Nielsen, 2017**). De plus, les mutants producteurs d'alginate, mais déficients en Psl et Pel sont incapables de former des biofilms (**Mah, 2012**). Aussi, il a été rapporté que les biofilms de *P. aeruginosa* produisent des molécules de rhamnolipides (**Figure 6**), d'élastases, de protéases et de pyocyanine qui endommagent les tissus pulmonaires et offrent une résistance aux antibiotiques (**Saxena et al., 2018**).

D'autres mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance des biofilms aux antibiotiques ont été cités dans la littérature, en particulier le QS, les mutations et le transfert des gènes (**Cooper et al., 2017; Zhao et al., 2020**).

4.2.1. Quorum Sensing

Le QS est un système de communication de cellule à cellule qui existe largement dans les microbiomes et qui est lié à la densité cellulaire. Le QS régule divers processus cellulaires, qui impliquent principalement la régulation de la luminescence bactérienne, des facteurs de virulence, de la tolérance aux désinfectants, de la formation de spores, de la production de toxines, de la motilité, de la formation de biofilms et de la résistance aux antibiotiques (**Figure 06**) (**Laverty et al., 2013; Zhao et al., 2020**). La croissance du biofilm est associée à des mécanismes régulés par le QS (**Høiby et al., 2010**). Les mécanismes de résistance conventionnels, tels que la bêta-lactamase chromosomique et les pompes à efflux sont en général régulés par un système QS (**Høiby et al., 2010**). **Balasubramanian et al. (2011)** ont démontré l'existence d'un réseau de co-régulation complexe entre la résistance aux bêta-lactamines, la production d'alginate, le QS et l'expression des gènes de virulence chez *P. aeruginosa*. L'implication d'un système QS bien organisé dans la résistance aux antimicrobiens chez les bactéries Gram-positif et Gram-négatif a été bien documentée par **Xu (2016)**. Le système LuxS/AI-2, coexistant chez les bactéries Gram-négatif et Gram-positif,

est un mécanisme de régulation, de type QS. Il a été démontré que le système LuxS/AI-2 contribue à la résistance aux antibiotiques, par des effets sur les pompes à efflux, les éléments génétiques mobiles, le système à deux composants "VraSR" et la voie de synthèse du folate (**Wang et al., 2019**). Il est à noter que le système à deux composants VraS/VraR (VraSR) régule l'induction transcriptionnelle de la protéine de liaison à la pénicilline 2 (codée par *pbp2*), par la vancomycine chez *S. aureus* (**Yin et al., 2006**).

4.2.2. Modification de l'expression génique et les interactions interspécifiques

Le développement du biofilm est aussi associé à un niveau accru de mutations, comme les mutations des molécules cibles des antibiotiques chez les bactéries, qui contribuent également à la survie des biofilms (**Høiby et al., 2010**). Les biofilms peuvent également augmenter les niveaux de résistance, en altérant l'expression de gènes de résistance préexistants (**Bottery et al., (2021)**).

Les biofilms fournissent les conditions compatibles pour le transfert horizontal de gènes, telles qu'une densité cellulaire élevée, une compétence génétique accrue et l'accumulation d'éléments génétiques ou l'absorption de gènes de résistance. La conjugaison est le seul mécanisme de transfert horizontal de gènes résistants dans les biofilms et peut confirmer la résistance à plusieurs antibiotiques. Il a été rapporté qu'au stade précoce du développement du biofilm, le traitement antibiotique était plus efficace, probablement en raison des cellules qui ne sont pas complètement adaptées aux communautés du biofilm (**Sharma et al., 2019**).

Par rapport aux biofilms mono-spécifiques, les interactions interspécifiques au sein des biofilms multi-spécifiques peuvent entraîner une augmentation supplémentaire de la survie pendant le traitement antibiotique en modifiant la structure spatiale du biofilm. Ces conclusions rapportées par **Bottery et al., (2021)** sont les résultats d'une étude réalisée sur *Klebsiella pneumonia*, *P. aeruginosa*, et *P. protegens*, par **Lee et al., (2014)** qui ont rapporté que le biofilm à espèces mixtes est plus résistant aux antimicrobiens (*i.e.* dodécyl sulfate de sodium et la tobramycine) que les biofilms à espèce unique. Toujours d'après les mêmes auteurs, une résilience au niveau de la communauté s'avère être une protection offerte par les espèces résistantes à l'ensemble de la communauté, plutôt qu'une sélection pour les espèces résistantes. En revanche, la résilience au niveau communautaire n'a pas été observée pour les cultures planctoniques d'espèces mixtes. Ces résultats suggèrent que les interactions au niveau communautaire, telles que le partage de biens publics, sont uniques à

la communauté structurée du biofilm, où les membres sont étroitement associés les uns aux autres. La composition et l'organisation spatiale (association lâche/étroite entre les espèces) d'un biofilm d'espèces mixtes peuvent avoir un impact sur la survie de la communauté et de ses membres lorsqu'ils sont confrontés à un stress (**Lee et al., 2014**).

Dans des biofilms mixtes, *P. aeruginosa* peut provoquer un changement métabolique chez *S. aureus*, réduisant sa croissance et lui conférant une protection contre la vancomycine. Réciproquement, *S. aureus* peut améliorer la tolérance à la tobramycine de *P. aeruginosa* en augmentant l'agrégation et en modifiant l'architecture du biofilm (**Bottery et al., 2021**).

5. Aliments et biofilms

La formation de biofilms peut avoir des conséquences différentes dans différents environnements (par exemple, système d'eau de refroidissement, industrie de transformation, industrie alimentaire et industrie du papier (**Poulsen, 1999**)).

Dans des environnements appropriés, de nombreux microorganismes pathogènes forment des biofilms sur les aliments et les surfaces en contact avec ses derniers (**Shi et Zhu., 2009**). Les maladies d'origine alimentaire liées aux biofilms bactériens sur les matrices alimentaires ou les équipements d'usine peuvent survenir via des intoxications ou des infections. Les toxines, par exemple, peuvent être sécrétées par le biofilm trouvé dans les usines de transformation d'aliments. De là, ils peuvent contaminer une matrice alimentaire, provoquant des intoxications individuelles ou multiples (en cas d'épidémie). Dans les deux cas, la présence de biofilms dans une usine alimentaire met la santé humaine en danger (**Galié et al., 2018**).

5.1. Mécanismes de contamination des aliments par les biofilms

Les biofilms sont problématiques dans des secteurs particuliers de l'industrie alimentaire, tels que la brasserie, la transformation des produits laitiers, les produits frais, la transformation de la volaille et la transformation de la viande rouge (**Simões et al., 2010**). Comme les biofilms sont en grande partie responsables de la détérioration des aliments et des épidémies, ils sont également considérés comme responsables des dommages causés aux équipements de transformation des aliments. D'où la nécessité de bien connaître l'ensemble des facteurs favorisant leur développement ou leur croissance, tels que la surface d'attache, les composants de la matrice alimentaire, les conditions environnementales, les

cellules bactériennes impliquées et la charge électrostatique des surfaces (**Carrascosa et al., 2021**). La matrice extracellulaire a un rôle structurel, qui est responsable de la forte persistance de ces biofilms dans l'industrie alimentaire. Il génère des gradients complexes, en ce qui concerne les nutriments et la diffusion de l'oxygène, contient des enzymes extracellulaires utilisées à des fins nutritionnelles, permet le transfert de molécules de communication cellulaire et protège les cellules intégrées contre les composés toxiques. En résumé, la formation de biofilm confère de nombreux avantages aux cellules microbiennes dans un environnement de l'industrie alimentaire, tels que la résistance physique contre la dessiccation, la résistance mécanique contre les flux liquides dans les canalisations et la protection chimique contre les produits chimiques, les antimicrobiens et les désinfectants utilisés dans l'industrie (**Galié et al., 2018**).

5.2. Impact des biofilm sur la production alimentaire

Les lignes de transformation alimentaire modernes sont un environnement propice à la formation de biofilms sur les surfaces en contact avec les aliments, principalement en raison de la complexité des usines de fabrication, des longues périodes de production, de la production de masse de produits et des grandes zones de croissance des biofilms. De nombreuses bactéries d'origine alimentaire peuvent donc se lier aux surfaces de contact présentes dans ces zones, ce qui pourrait contribuer à augmenter le risque de maladies bactériennes d'origine alimentaire (**Carrascosa et al., 2021**). L'adhérence de *Salmonella* aux surfaces alimentaires a été le premier rapport publié sur le biofilm bactérien d'origine alimentaire (**Shi et Zhu., 2009**). Depuis lors, un certain nombre de documents ont décrit la capacité des agents pathogènes d'origine alimentaire à se fixer aux aliments et aux surfaces en contact avec les aliments, y compris *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7. Des investigations ont révélé que les biofilms contenant des agents pathogènes comme *L. monocytogenes* sont devenus l'une des principales causes de contamination des produits alimentaires ou de transmission de maladies (**Shi et Zhu., 2009; Cappitelli et al., 2014**). Par ailleurs, il a été signalé que l'attachement de bactéries pathogènes et de détériorations potentielles aux surfaces en contact avec les aliments et la formation de biofilms qui s'ensuit représentent de sérieux défis pour l'industrie de viande; car ils peuvent entraîner une contamination croisée des

produits, entraînant une réduction de la durée de conservation et la transmission de maladies (**Giaouris et al., 2014; Castellano et al., 2017**).

Gutierrez et al., (2012) ont montré que les surfaces de contact alimentaire dans les industries laitière, des viandes et des fruits de mer étaient colonisées par des biofilms de *S. aureus*. De même, **Gounadaki et al., (2008)** ont montré que la plupart des surfaces en contact avec les aliments, dans les installations de transformation à petite échelle, étaient contaminées par les biofilms de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. et *S. aureus*. De même, **Latorre et al., (2010)** ont observé la présence de biofilms sur les équipements des élevages laitiers. **Sharma et Anand, (2002)** ont également mis en évidence la persistance de biofilms sur différents segments des lignes de pasteurisation, dans les usines commerciales, malgré un nettoyage quotidien. Ces auteurs ont également indiqué la prévalence d'une grande variété de bactéries pathogènes telles que *S. aureus* et *E. coli* (**Abdellah et al., 2014**). Les aliments frais et peu transformés présentent un risque élevé de contamination bactérienne (**Jeddi et al., 2014**). Dans l'industrie laitière, un large éventail de bactéries thermophiles et psychrophiles habite les différentes étapes de transformation et de pasteurisation. Les spores persistantes de *Bacillus cereus* collées aux surfaces industrielles agissent comme un film de conditionnement favorisant la fixation rapide des cellules bactériennes introduites dans le système qui seraient autrement éliminées par des méthodes efficaces contre les cellules planctoniques (**Coughlan et al., 2016**).

Présentation d'articles scientifiques

Article 1: *Staphylococcus aureus* Isolated From Handmade Sweets: Biofilm Formation, Enterotoxigenicity and Antimicrobial Resistance. Kroning S.I., Iglesias A.M., Sehn P.C., Valente Gandra K.T., Mata M.M. & da Silva P.W., 2016. *Food Microbiology*, 58:105-111.

Article disponible sur: <https://wp.ufpel.edu.br/labmicro/files/2016/03/Isa.pdf>

Description de l'étude

Cette étude a pour thème principal l'étude de la formation de biofilm, l'entérotoxicité et la résistance aux antimicrobiens chez *Staphylococcus aureus* isolé des bonbons faits à la main à Pelotas City/Brésil. Elle a été réalisée par Kroning et ses collaborateurs de l'université fédérale de Pelotas, RS, Brésil de l'unité de biotechnologie, Centre de développement technologique et publiée en 2016 par Elsevier Ltd dans *Food Microbiology*.

Justification du choix de l'article

Le présent article correspond exactement à la thématique de notre mémoire, puisqu'il traite de la formation des biofilms par des bactéries antibio-résistante d'origine alimentaire.

1. Résumé

Les auteurs ont rapporté que *Staphylococcus aureus* est le deuxième agent pathogène le plus important impliqué dans les épidémies d'origine alimentaire au Brésil et que la contamination par *S. aureus* des produits alimentaires à large distribution, comme les bonbons faits à la main est facile. Le but de cette étude était d'isoler et d'identifier des staphylocoques coagulase positive (CPS) à partir de bonbons artisanaux produits à Pelotas City/Brésil. Le potentiel de virulence des isolats a été vérifié, en évaluant la présence des gènes d'entérotoxine staphylococcique icaA et icaD, le potentiel de formation de biofilm et la résistance antimicrobienne. Tous les isolats de *S. aureus* retenus avaient une capacité de formation de biofilm sur l'acier inoxydable et plus de la moitié d'entre eux sur des surfaces en polystyrène. La majorité des isolats portaient les gènes icaA (66,6 %) et icaD (58,4 %) et certains d'entre eux avaient les gènes codant pour les entérotoxines A (33,4 %) et B (16,6 %). De plus, la majorité des isolats (83 %) étaient résistants à au moins un des antimicrobiens testés et une multi-résistance a été observée dans 8,4 % des isolats. Les isolats avaient un potentiel de virulence et la moitié d'entre eux étaient entérotoxinogènes. En outre, la capacité de tous les isolats à produire des biofilms met en évidence le danger que

représentent ces microorganismes potentiellement virulents persistant dans les environnements de fabrication alimentaire

2. Introduction et objectifs

Tout d'abord, les auteurs ont décrit la ville de Pelotas (Brésil) étant un centre de production et de vente des bonbons faits à la main (confiseries artisanales), en raison de son histoire de colonisation portugaise. Cette ville est considérée comme la capitale brésilienne des douceurs sucrées, et produit commercialement une grande quantité tout au long de l'année, environ 150.000 unités/mois. Ensuite, les auteurs posent la problématique, par le fait que les bonbons soient principalement fabriqués manuellement et, par conséquent, ils peuvent être facilement contaminés par *S. aureus*, soit par les manipulateurs, soit par des biofilms formés sur les surfaces des équipements et des ustensiles utilisés pour leur préparation. Ces coques mésophiles à Gram positif, anaérobies facultatifs, non mobiles et non sporulés produisent des entérotoxines à des températures comprises entre 10°C et 46°C. La description des auteurs va d'une part jusqu'aux facteurs impliqués dans la virulence de *S. aureus*, qui est un processus multifactoriel impliquant la production d'une variété de ligands cellulaires et des protéines sécrétées, avec la formation de biofilm. D'autre part, aux entérotoxines staphylococciques classiques (A, B, C, D et E) responsables de 95% des cas d'épidémies d'intoxications alimentaires, et dont les types A et C sont les plus courants. Certains aspects moléculaires liés à la capacité de formation de biofilm par *S. aureus* incluant entre autres, l'opéron *ica* ont aussi été signalés. Les auteurs ont conclu cette introduction, en indiquant que les biofilms réduisent l'efficacité des désinfectants, en causant des pertes économiques à l'industrie, par la contamination des aliments et l'augmentation du niveau de résistance aux antimicrobiens. Vu l'importance du sujet, cette étude a été proposée pour démontrer la présence des staphylocoques à coagulase positive (CPS) dans des bonbons artisanaux, faits à la main, de vérifier le potentiel de virulence des isolats, en recherchant les gènes *icaA* et *icaD*, de l'entérotoxine staphylococcique, et de déterminer aussi, leur potentiel de formation de biofilm et leurs profils de résistance aux antimicrobiens.

2. Matériel et Méthodes

Le protocole de ce travail s'est basé sur une méthodologie expérimentale classique et bien référencée, permettant d'atteindre les objectifs visés par l'étude. Les méthodes suivies seront présentées tel qu'elles ont été décrites par les auteurs.

2.1. Isolement et confirmation phénotypique des staphylocoques à coagulase positive

Un total de 50 échantillons de bonbons faits à la main produits à Pelotas City/ Brésil a été analysé pour la présence des CPS. L'isolement des CPS a été réalisé en utilisant une méthodologie décrite par l'association américaine de santé publique (**APHA, 2002**). Pour ce faire, 25g d'échantillons frais ont été homogénéisés dans 225mL d'eau peptonée à 0,1% (Acumedia®). Des dilutions en série ont été effectuées et des aliquotes de 0,1 ml ont étéensemencées sur la gélose Baird-Parker (BPA, Himedia®) contenue en boîtes de Pétri et incubées à 37°C, pendant 48 h. Les colonies typiques des CPS ont été identifiées par le test de production de coagulase libre (APHA, 2002). Ensuite, les isolats qui avaient la capacité de produire la coagulase *in vitro* ont été soumis au test de résistance à l'acriflavine (Sigma Aldrich®), en utilisant du BPA, additionné d'acriflavine (7 mg mL⁻¹). Les isolats ont été mis en culture dans du bouillon Cœur-Cerveau (BHI, Acumedia®) et incubés à 37°C, pendant 24 h. Un inoculum a été étalé sur des boîtes contenant du BPA plus acriflavine et incubé à 37°C pendant 48h. Le résultat caractéristique était l'apparition de deux halos autour des colonies. Ce test a été réalisé sur les espèces CPS, pour confirmer l'identification des *S. aureus* résistants à l'acriflavine (**Devriese, 1981**).

2.2. Confirmation moléculaire des isolats

2.2.1. Extraction d'ADN

L'ADN génomique a été extrait selon le protocole recommandé par Matthews et al. (1997) avec des modifications. Une culture de CPS sur Trypticase Soja agar (TSA, Acumedia®) a été transférée dans 100 mL de solution TE (10 mM d'hydroxyméthylaminométhane - TRIS et 5 mM d'acide éthylènediamine tétra acétique e EDTA), jusqu'à l'obtention d'une turbidité de 1,0 sur l'échelle de McFarland (1-2 colonies). La lyse de la paroi cellulaire a été effectuée par addition de 100µL de lysostaphine et incubation à 37°C pendant 45 min, suivie par l'ajout de 20mL de tampon TBE (50 mM d'hydroxy-méthyle-amino-éthane-TRIS et 20 mM d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique-EDTA), avec du SDS (20 %) (dodécyl sulfate de sodium,

Invitrogen®), et 3 mL de protéinase K (2 mg/100 µL, Invitrogen®), et une incubation à 37°C pendant une heure. Ensuite, 200 µL de NaCl (5M) (chlorure de sodium, Synth®) ont été ajoutés et mélangés doucement pendant 15S, suivi d'une centrifugation (10.000 x g, 4°C, 15 min). La couche supérieure a été transférée dans un tube stérile et traitée avec du phénol chloroforme: alcool iso-amylque dans la proportion (25:24:1, Synth®) et centrifugée (16.000xg, 4°C, 15 minutes). L'ADN a été ensuite précipité avec deux volumes d'éthanol froid à 95% et laissé reposer, pendant une nuit à -20 C°. Après centrifugation (16.000xg, 4°C, 10 min), le culot est lavé deux fois avec l'éthanol (70%) et séché pendant 30 min. Il a été re-suspendu dans 30 µL d'eau ultra-pure, puis 2 µL de RNase (10 mg/mL, Invitrogen®) ont été ajoutés et le mélange a été incubé à 37°C pendant une heure. L'ADN a été maintenu à -20°C et quantifié par spectrophotométrie, en utilisant un EppendorfBioSpectrometerkinetic® (Eppendorf).

2.2.2. PCR multiplex (PCR m)

La PCR multiplex a été réalisée pour identifier les espèces de CPS, en ciblant le gène de l'ARNr 16S pour l'identification du genre et le gène nuc codant, pour l'enzyme thermonucléase (un jeu d'amorces pour chaque espèce: *S. aureus* - nuc 1, 2; *S. intermedius* - nuc 5, 6 ; et *S. hyicus* - nuc 7, 8, a été utilisé). Les amorces et les programmes utilisés sont montrés dans le Tableau I.

Les mélanges réactionnels contenaient 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2x (PromegaCorp), 1 µL de chaque amorce à une concentration de 10 pmol pour le gène de la thermonucléase et 1 pmol pour le Gène d'ARNr 16S, 2 µL d'ADN (50 ng) et 2,5 µL d'eau ultra-pure (PromegaCorp), pour un volume réactionnel total de 25 µL. Les mélanges étaient placés dans un thermocycleur "MJ Research® PTC 100". Les souches utilisées comme contrôles positifs et négatifs pour l'identification des espèces bactériennes et du genre sont présentées dans le tableau II. Les produits de PCR ont été soumis à une électrophorèse à 80 V pendant 70min sur un gel d'agarose 1,5% dans un tampon TBE 0,5x (solution tris, acide borique –EDTA), en présence d'un marqueur de poids moléculaire de 1 Kb (Invitrogen®). Les produits amplifiés ont été visualisés par trans-illumination UV (Loccus®, L-PixTouch).

Tableau I: Amorces utilisées pour l'identification des staphylocoques à coagulase positive et des gènes de virulence.

Amorces	Séquence 5'- 3'	pb	Programme	Références
NUC1	ATGAAGTCAAATAAATCGCT	458	P1	Baron et al. (2004)
NUC2	TTTGGTGAAAAATACTTCTC			
NUC5	GAAAAAATTACAACAGGCG	106	P1	Gandra et al. (2011)
NUC6	CACATCCGTTGAAGACTTTT			
NUC7	TAAGACACCGATAAAAGCCC	740	P1	Bastos (2008)
NUC8	TTGTTTTGTGCTTGTCTATAC			
16S1	GGACGGGTGAGTAACACGTGG	252	P1	Baron et al. (2004)
16S2	TCCCGTAGGAGTCTGGACCGT			
SEA1	ACGATCAATTTTACAGC	544	P2	Rosecet Gigaud (2002)
SEA2	TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC			
SEB1	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGGA	404	P2	Jarraud et al. (2002)
SEB2	ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT			
SEC1	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257	P3	RosecetGigaud (2002)
SEC2	AAATCGGATTAACATTATCCA			
SED1	CAAATATATTGATATAATGA	330	P2	Zocche et al. (2009)
SED2	AGTAAAAAAGAGTAATGCAA			
SEE1	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC	482	P2	Jarraud et al. (2002)
SEE2	CACCTTACCGCCAAAGCTG			
icaA F	CCTAACTAACGAAAGGTAG	1315	P4	Vasudevan et al. (2003)
icaA R	AAGATATAGCGATAAGTGC			
icaD F	AAACGTAAGAGAGGTGG	381	P4	
icaD R	GGCAATATGATCAAGATAC			

P=4 min à 95 C° ; 2 min à 95 C°, 2 min à 52,7 C°, 2 min à 72 C° pendant 32 cycles ; 7 minutes à 72°C ; P2 = 5 min à 95 C°, 1 min à 95 C°, 1 min à 44,5 C°, 1 min à 72 C°) pour 37 cycles 10 min à 72°C ; P3 = 5 min à 95 C° ; 45 s à 95 C°, 45 s à 46,2 C°, 45 s à 72 C°) pendant 35 cycles ; 10 min à 72°C ; P4 = 45 s à 92 C°, 45 s à 49 C°, 1 min à 72 C° pendant 30 cycles.

2.3. Capacité à former des biofilms

En continuation, les auteurs ont évalué la capacité de production de biofilm sur des surfaces en polystyrène (PS) et en acier inoxydable (SS) à 25°C.

La capacité de formation de biofilm sur les PS a été évaluée à l'aide de plaque de micro-titrage en polystyrène stérile à 96 puits, conformément au protocole proposé par (Stepanovic et al., 2007). La densité optique de chaque puits coloré a été mesurée à 570 nm, en utilisant un lecteur de microplaque ELISA analyseur de plaques (Robo-nick®, readwell PLAQUE). Le contrôle négatif utilisé était une solution saline à 0,85%, et *S. aureus* ATCC 25923 et *S. aureus* ATCC 6538 ont été utilisés comme contrôles positifs.

Par ailleurs, des Coupons circulaires en acier inoxydable traité (AISI 304 - 18% de chrome et 8% de nickel, combiné à un maximum de 0,08 % de carbone, 8cm de diamètre) ont été utilisés, pour évaluer la capacité de formation de biofilm. Les coupons ont été lavés avec des

brosses à poils doux, avec un détergent neutre et de l'eau distillée. Après rinçage, ils ont été plongés dans de l'acétone pendant 24h pour éliminer les graisses résiduelles. Ensuite, ils ont été plongés dans une solution de NaOH 0,1N pendant une heure, rincés trois fois à l'eau distillée et soumis à un bain à ultrasons pendant une heure (Unique®, Model 1400A, 40 kHz). Enfin, avant utilisation, les coupons ont été individuellement emballés et stérilisés. Les isolats ont été testés en double, comme proposé par **Rieu et al. (2008)**, avec des modifications.

Afin d'évaluer la formation de biofilm sur les aciers inoxydables, les coupons ont été placés dans des boîtes de Pétri contenant du TSB additionné de 1% de glucose. Les isolats ont été inoculés à une concentration de 0,5 McFarland (1/100, $\sim 10^8$ UFC/ml), et incubés à 25°C pendant 24h. Par la suite, le milieu de culture a été retiré et les coupons ont été lavés deux fois avec 10 ml de tampon PBS (Tampon phosphate salin) (Laborclin®), pour éliminer les cellules faiblement adhérentes. Ils ont été séchés pendant 24h à 25°C. Ensuite, les cellules fortement adhérentes ont été retirées des surfaces par des écouvillons stériles trempés dans une solution saline à 0,85%, et vortexer pendant 1 min. Des dilutions décimales successives ont été réalisées en double, et étalées sur TSA, puis les cultures sont incubées à 37°C pendant 24h.

2.4. Analyses statistiques

Les données de formation de biofilm sur PS et SS ont été soumises à une analyse statistique de variance (ANOVA), en utilisant le test de Tukey ($p < 0,05$), avec le logiciel STATISTICA 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA).

2.5. Détection des gènes *icaA*, *icaD* et des entérotoxines classiques

La présence des gènes *icaA* et *icaD* a été évaluée par PCR, selon le protocole proposé par **Vasudevan et al. (2003)**, avec des adaptations. La solution réactionnelle contenait 12,5 μ L de GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega Corp.), 1 μ L de chaque amorce, 2 μ L d'ADN et 8,5 μ L d'eau ultra pure (Promega Corp.), pour un volume final de 25 μ L. Des amorces ciblant les gènes codant pour les entérotoxines staphylococciques classiques (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* et *see*) ont été utilisées et les réactions ont été préparées comme décrit ci-dessus, pour la présence des gènes *icaA* et *icaD*. Les contrôles positifs et négatifs utilisés dans les réactions pour *icaA*,

icaD et les gènes classiques de l'entérotoxine sont montrés dans le tableau II. Les amorces utilisées, ainsi que les programmes et applications, sont présentés dans le tableau I.

Tableau II: Caractérisation des souches du groupe d'espèces et des isolats utilisés dans cette étude.

Espèce	Souche	Source	Application
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	Isolat clinique	PC: mPCR (nuc 1, 2), gènes icaA et icaD, tests de résistance aux antimicrobiens et de formation de biofilm
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	Lésion humaine	Tests de formation de biofilm
<i>S. intermedius</i>	ATCC 29663	narines de pigeon	PC mPCR (nuc 5 et 6)
<i>S. hyicus</i>	ATCC 11249	Porc avec épidermite exsudative	PC mPCR (nuc 7 et 8)
<i>S. xylosum</i>	ATCC 29971	Peau humaine	NC mPCR (espècebactérienne)
<i>S. sciuri</i>	ATCC 29061	Peau d'écureuil volant du sud	NC mPCR (espèce bactérienne)
<i>S. lugdunensis</i>	ATCC 49576	Isolat clinique	NC mPCR (espècebactérienne)
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	Isolat clinique	NC mPCR (espèce bactérienne) et NC icaA et icaD
<i>S. haemolyticus</i>	ATCC 29970	Peau humaine	NC mPCR (espècebactérienne)
<i>S. capitis</i>	ATCC 35661	Peau humaine	NC mPCR (espècebactérienne)
<i>S. saprophyticus</i>	ATCC 15305	Urine	NC mPCR (espècebactérienne)
<i>S. simulans</i>	ATCC 27851	Peau humaine	NC mPCR (espècebactérienne)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229	Isolat clinique	NC mPCR (genre)
<i>S. aureus</i>	ATCC 19095	Poulet	PC sea et sebgenes
<i>S. aureus</i>	ATCC 19095	Abcès de la jambe	PC sec gène
<i>S. aureus</i>	FRI 361	Poulet	PC sed gène
<i>S. aureus</i>	FRI 326	Poulet	PC see gène
SAS 1 - 12	Cette étude	Des bonbons faits à la main	Tests de résistance aux antimicrobiens et de formation de biofilm

PC: contrôle positif; NC: contrôle négatif; ATCC: American Type Culture Collection; FRI: Institut de recherche alimentaire.

2.6. Tests de résistance aux antimicrobiens

Les cultures actives des isolats ont été maintenues sur TSA (Acumedia®), après incubation à 37°C pendant 24h. Les inoculums ont été obtenus à partir de cultures en bouillon d'une nuit ajustées à environ $1,4 \times 10^8$ UFC/ml, une turbidité équivalente à 0,5 McFarland. Les inoculums ont été étalés à la surface de boîtes contenant la gélose Mueller-Hinton (MHA).

Le test de diffusion à partir de disque, recommandé par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015), a été utilisé pour déterminer la sensibilité à 12 antimicrobiens: gentamicine (10 µg), chloramphénicol (30 µg), clindamycine (2 µg), sulfamide (300 µg), ampicilline (10 mg), ciprofloxacine (5 µg), érythromycine (15 µg), vancomycine (30 µg), tétracycline (30 mg), pénicilline (10 U), céphalothine (30 mg) et céfoxitine (30 mg), achetés auprès de la société Laborclin®. Les résultats ont été interprétés conformément aux normes

pour les diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus* spp. (CLSI, 2015). *S. aureus* ATCC 25923 a été utilisé comme contrôle positif pour les tests.

3. Résultats

Dans cet article la section des résultats est séparée de la discussion. Les résultats sont présentés d'une façon succincte et claire, c'est la raison pour laquelle, ils seront exposés tel qu'ils ont été publiés par les auteurs.

3.1. Isolement et identification des staphylocoques à coagulase positive

Sur les 50 échantillons de bonbons faits à la main, six (12 %) étaient contaminés par le CPS. Douze isolats ont été sélectionnés (échantillon un: deux isolats, échantillon deux: trois isolats, échantillon trois: quatre isolats; échantillon quatre: cinq et six: un isolat) et désignés SAS (*S. aureus* sweet) 1-12. Tous les isolats étaient résistants à l'acriflavine, et donc caractérisés phénotypiquement comme *S. aureus* (Capurro et al., 2010; Devriese, 1981; Matos et al., 1991). Après les tests moléculaires, tous les isolats ont été confirmés comme étant *S. aureus*, puisqu'il y a eu amplification d'un fragment de 252 pb lié à l'ARNr 16S, spécifique du genre *Staphylococcus*, et l'amplification d'un fragment de 458 pb produit par le jeu d'amorces nuc 1 et 2, spécifiques à ce microorganisme, comme le montre la Figure 1.

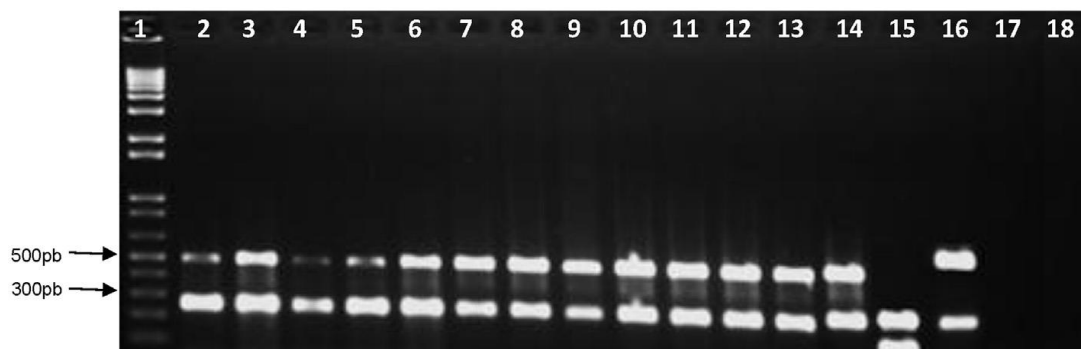


Figure 1. Produits PCR obtenus avec les amorces nuc 1- nuc 2 (458 pb), nuc 5- nuc 6 (106 pb), nuc 7-nuc 8 (740 pb) et ARNr 16S (252 pb). 1) 1Kb Marqueur de poids moléculaire standard (1 Ko Invitrogène); 2-13) Staphylocoques à coagulase positive isolés de bonbons faits à la main ; 14) contrôle positif (*S. aureus* ATCC 25923) ; 15) *S. intermedius* ATCC 29663; 16) *S. hyicus* ATCC 11249; 17) contrôle négatif (*E. coli* ATCC 11229); 18) contrôle de la réaction - eau ultra-pure stérile.

3.2. Capacité à former des biofilms

Dans le test de formation de biofilm sur PS, 41,6% des isolats ont été caractérisés comme de faibles producteurs de biofilm et 58,4% comme non producteurs de biofilm. Cette caractérisation a été donnée en se référant à **Stepanović et al.,(2007)**. Il y avait des différences significatives entre les isolats ($p < 0,05$), comme le montre la figure 2. La capacité de formation de biofilm la plus élevée a été montrée par SAS10, suivie par SAS9 et SAS11. Il n'avait pas de différences significatives ($p < 0,05$) entre eux, mais des différences significatives ont été observées entre les trois plus grands producteurs de biofilm et les autres isolats.

Tous les isolats ont également produit des biofilms sur les surfaces SS à 25°C ($\log \text{ UFC/cm}^2$), comme le montre la figure 3. Les différences entre les isolats étaient significatives ($p < 0,05$). La capacité la plus élevée de formation de biofilm a été observée pour SAS7 suivi de SAS8, SAS6 et SAS1, sans différences significatives ($p > 0,05$) entre eux. La plus faible capacité de formation de biofilm a été observée pour SAS5 et SAS4, avec une différence significative ($p > 0,05$) entre eux.

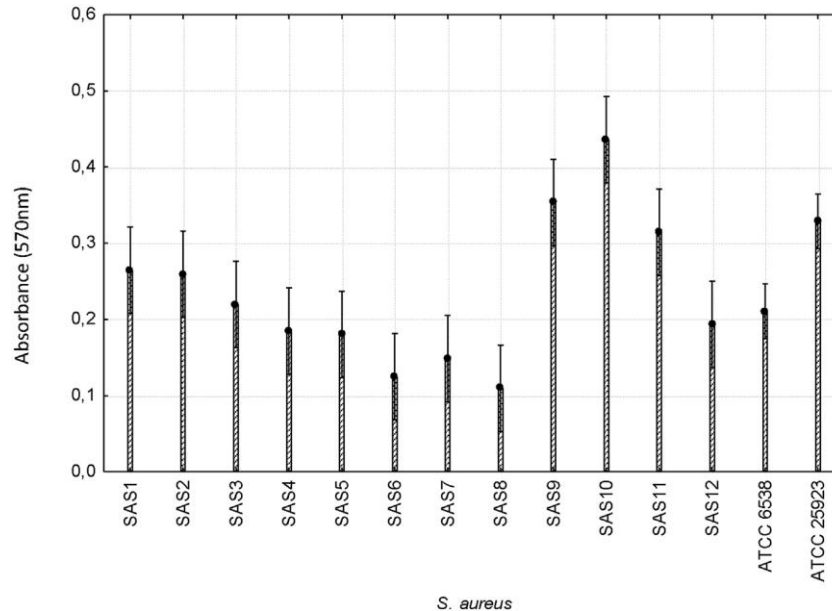


Figure 2. Résultats de formation de biofilm (surface PS) pour tous les isolats de *S. aureus* testés ($n=12$) cultivés dans du TSB supplémenté avec 1% de glucose à 25°C, pendant 24 h. La moyenne de trois mesures indépendantes est présentée. Les barres d'erreur indiquent l'écart type.

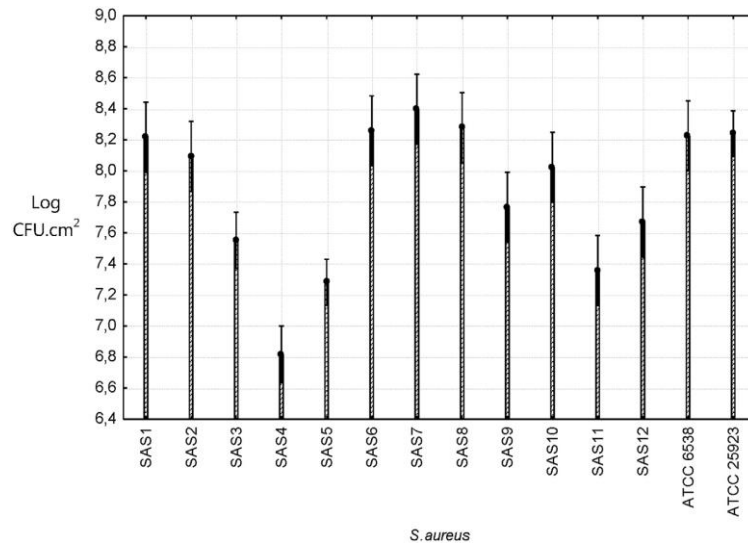


Figure 3: Comptages viables d'isolats de *S. aureus* (n=12) cultivés dans du TSB supplémenté avec 1% de glucose à 25°C pendant 24h. La moyenne des mesures indépendantes en double est présentée. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type.

3.3. Présence des gènes *icaA*, *icaD* et des entérotoxines classiques

Les résultats de cette analyse ont montré que le gène *icaA* a été trouvé dans 66,6 % des isolats et le gène *icaD* dans 58,4%, et la présence des deux gènes a été observée dans 58,4 % des isolats. Quatre isolats (33,4 %) n'avaient aucun de ces gènes (*icaA* et *icaD*), mais ils étaient capables de former des biofilms. Par ailleurs, les gènes d'entérotoxines A et B ont été détectés dans 33,4% et 16,6% des isolats, respectivement. Cependant, aucun des isolats n'avait de gènes codant pour les entérotoxines C, D et E. L'isolat SAS8 avait les gènes des deux entérotoxines A et B. Ces résultats sont présentés dans le tableau III.

Tableau III: Présence des gènes *icaA* et *icaD*, liés à la formation de biofilm et à la présence de gènes d'entérotoxines (A, B, C, D et E) chez *S. aureus* isolés à partir de bonbons faits à la main.

Isolats	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>
SAS1	+	+	+	-	-	-	-
SAS2	+	+	+	-	-	-	-
SAS3	+	-	-	-	-	-	-
SAS4	-	-	-	-	-	-	-
SAS5	+	+	-	-	-	-	-
SAS6	+	+	+	-	-	-	-
SAS7	-	-	-	-	-	-	-
SAS8	-	-	+	+	-	-	-
SAS9	-	-	-	-	-	-	-
SAS10	+	+	-	-	-	-	-
SAS11	+	+	-	+	-	-	-
SAS12	+	+	-	-	-	-	-

3.4. Test de résistance aux antibiotiques

Les tests de sensibilité aux antibiotiques qui sont indiqués dans le tableau IV montrent que les isolats étaient résistants à l'ampicilline (66,6%), à la pénicilline (66,6%), à la tétracycline (33,4%), à l'érythromycine (8,4%) et aux sulfamides (8,4%). De plus, une résistance intermédiaire à la gentamycine (8,4%) a été observée. Une multi-résistance à l'érythromycine, à la tétracycline, à l'ampicilline et à la pénicilline a été aussi observée dans 8,4% des isolats.

Tableau IV: Zone moyenne d'inhibition et pourcentage de résistance aux antimicrobiens de *S. aureus* isolé à partir de bonbons faits à la main.

Isolats antimicrobiens	Zone d'inhibition moyenne (mm)												Résistance (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Gentamicine (10µg)	26.5	25.5	23.5	24.5	14	26	27	26	32	33	24	26	0
Chloramphénicol (30 µg)	26	26.5	25.5	28	28	31.5	31	30	28	30	28	28	0
Clindamycine (2 µg)	31	29	30	31.5	33	34	30	25.5	33	31	29	27	0
Sulfonamide (300 µg)	35	33	31.5	10	34.5	19.4	22.5	26	34	30	18	25	8.4
Ampicilline (10 µg)	49	49	16	17	16.5	21.5	21	22.5	36	35	20	22	66.6
Ciprofloxacine (5 µg)	33.5	34	32.5	35	30	37	33.5	32.5	31	32	35	32	0
Érythromycine (15 µg)	26	27.5	28.5	29.5	26	35	29	10	31	30	28	29	8.4
Vancomycine (30 µg)	26.5	20.5	20	21	21.5	19.5	21	20	21	21	20	20	0
Tétracycline (30 µg)	31.5	30.5	29.5	28	29	29.5	29.5	10	7	8	8	29	33.4
Pénicilline (10 µg)	49.5	51	15.5	16	16	21.5	21.5	22	35	37	20	22	66.6
Céphalothine (30 µg)	43.5	43.5	30	30.5	13	33.5	34.5	36	41	40	32	36	8.4
Céfoxitine (30 µg)	31	35.5	29	28	31.5	22.5	22.5	28.5	29	29	30	27	0

4. Discussion

La section "discussion" a été très bien développée par rapport à la section "résultats". Elle a été bien étayée, en citant des exemples très pertinents de différents travaux scientifiques.

Pour commencer, les auteurs ont rappelé que les bonbons faits à la main sont largement manipulés manuellement et ne sont soumis à aucun traitement thermique ou antimicrobien ultérieur. Ainsi, ce type d'aliment est fréquemment contaminé par *S. aureus*. Ces microorganismes ont la capacité de former des biofilms sur les surfaces biotiques et abiotiques, et ils sont capables de se multiplier sur la peau et les muqueuses des manipulateurs d'aliments (**Trabulsi et Alterthum, 2008**). Cette étude a montré que 12% des échantillons étaient contaminés par *S. aureus*, ce qui peut indiquer qu'il y a eu une mauvaise manipulation et/ou que les équipements et les surfaces ont été contaminés par des biofilms formés par ces bactéries. Pour marquer cette présence de *S. aureus* dans les aliments, les auteurs ont cité d'autres travaux ayant signalé la prévalence de *S. aureus* dans plusieurs

types d'aliments. **Di Giannatale et al. (2011)** ont évalué différents aliments d'origine animale et ont constaté que 14% des échantillons étaient contaminés par *S. aureus*. **Vitale et al. (2015)** ont aussi évalué le lait, le fromage, la viande et les ingrédients pour la préparation d'aliments et ont constaté que 10,5% des échantillons étaient contaminés par *S. aureus* et que dans 46% de ces isolats, au moins un gène d'entérotoxine était présent. Les auteurs de ces deux travaux soulignent qu'une bonne hygiène des manipulateurs d'aliments, ainsi qu'un nettoyage correct des surfaces de préparation des aliments, devraient diminuer la contamination par ce microorganisme, minimisant ainsi le risque de maladie.

Les auteurs mentionnent qu'il faut tenir compte du fait qu'en ce qui concerne la formation de biofilm sur des coupons SS, le résultat est exprimé en concentration de bactéries viables par cm^2 . Cependant, lorsque la formation de biofilm est évaluée sur des microplaques en PS, les résultats des mesures de DO incluaient les concentrations de cellules viables et mortes. Les auteurs rapportent aussi que la concentration bactérienne trouvée sur une surface qui est délibérément nécessaire pour qu'elle soit considérée comme un biofilm varie selon les auteurs. Selon **Andrade et al. (1998)**, un minimum de 10^7 cellules par cm^2 est requis à cet objectif. **Ronner et Wong (1993)** et **Wirtanen et al. (1996)** considèrent un biofilm avec une concentration cellulaire de 10^5 et 10^3 cellules par cm^2 , respectivement. En effet, tous les isolats évalués dans cette étude ont donné des concentrations supérieures à 10^7 UFC cm^{-2} pour les cellules adhérant aux coupons d'acier inoxydable. Par conséquent, les auteurs ont déduit que ces isolats sont de forts formateurs de biofilm sur les surfaces d'acier inoxydable (**Andrade et al., 1998**). La présence des gènes *icaA* et *icaD* indique que les isolats ont la capacité génétique de former des biofilms. Cependant, les auteurs et en se basant sur certaines références (**O'Gara, 2007; Rode et al., 2007; Ferreira et al., 2012; Giaouris et al., 2015**) signalent que les gènes du locus *ica* ne sont pas les seuls responsables de cela, car les isolats peuvent utiliser à la fois un mécanisme *ica*-dépendant et indépendant de l'*ica* pour la formation de biofilm. De plus, les auteurs rapportent que des études ont montré qu'il existe des variations dans l'expression des gènes du locus *ica* parmi les isolats de *S. aureus*. Par exemple, lorsque *S. aureus* est exposé à différentes températures, durées et surfaces de contact, différents profils d'expression génique peuvent être observés (**Atshan et al., 2013; Stanley et Lazazzera, 2004**). Comme il a été observé dans cette étude, 33,4% des isolats ont formé des biofilms indépendamment de la présence des gènes du locus *ica* (*SAS4*, *SAS7*, *SAS8*, *SAS9*), ce qui a révélé l'existence d'un mécanisme indépendant d'*ica*. Dans cette

étude, une température de 25°C a été testée, pour simuler la température de l'environnement de traitement des bonbons faits à la main. **Rode et al. (2007)** ont trouvé que les températures inférieures à la température optimale pour la multiplication de *S. aureus* (37°C) augmentaient la formation de biofilm et augmentaient ainsi le risque de contamination des aliments par des isolats capables de former un biofilm. Les mêmes auteurs ont constaté que chez *S. aureus* isolé d'aliments, il existait de puissants formateurs de biofilm dans des conditions similaires à celles trouvées dans l'industrie alimentaire (20 et 25°C/24h). Des résultats similaires obtenus par **Vazquez-Sanchez et al. (2014)** ont montré que tous les isolats de *S. aureus* provenant de produits de la pêche (vingt-six isolats) avaient une grande capacité à former des biofilms, avec des numérations cellulaires supérieures à 10^4 UFC cm⁻² après 5h à 25°C sur une surface SS, ce qui implique que la transformation d'aliments peut exercer une pression sélective. Ces descriptions ont également été observées dans cette étude, dans laquelle 100% des isolats étaient capables de former des biofilms à 25°C sur des surfaces SS. Cette étude suggère que des facteurs, tels que des températures inférieures à la température optimale pour la croissance de ces microorganismes et une pression sélective pendant le traitement, peuvent influencer positivement la formation de biofilm et la contamination conséquente des échantillons de bonbons faits à la main.

Concernant les entérotoxines, le gène de l'entérotoxine A était prévalent (33,4%) parmi les isolats, indiquant un risque élevé que ces isolats provoquent une intoxication alimentaire staphylococcique (**Kerouanton et al., 2007**). Outre la présence du gène de l'entérotoxine A, 16,6 % des isolats portaient également le gène de l'entérotoxine B. La prévalence de ces deux toxines a également été examinée par d'autres auteurs lorsqu'ils ont évalué *S. aureus* isolé des aliments. **Song et al. (2015)** ont trouvé que 5,6% des isolats provenant d'aliments crus et transformés portaient le gène de l'entérotoxine A (sea) et 3,5% portaient le gène de l'entérotoxine B (seb). De même, **Zhang et al. (2013)** ont trouvé le gène sea dans 24,1% des isolats et le gène seb dans 4,2% des isolats provenant de: produits carnés crus, produits carnés cuits ou enfournés, produits laitiers, aliments surgelés, légumes prêts à consommer, produits aquatiques, produits à base d'haricot et produits de la ruche. Ces auteurs ont également trouvé que 20,5% des isolats portaient le gène sed, 6,8% le gène sec et 0,6% le gène see. Contrairement à la présente étude, les isolats ne portaient aucun de ces gènes. Même en l'absence des gènes sec, sed et see, ces isolats ont un potentiel entérotoxigène,

car ils peuvent posséder les gènes *sea* et *seb*. Le gène *sea* est le plus souvent signalé dans les aliments contaminés et est également considéré comme la principale cause d'intoxication alimentaire staphylococcique dans le monde, tandis que le gène *seb* est connu pour favoriser une intoxication plus grave que les autres entérotoxines (**Argudín et al., 2010; Carfora et al., 2015**).

La majorité des isolats avaient les gènes *icaA* et *icaD*, facilitant la formation de biofilms. Cependant, ce n'est pas le seul mécanisme impliqué car il y avait quelques isolats qui ne présentaient pas ces gènes et qui étaient encore capables de former des biofilms sur l'acier inoxydable, comme l'isolat SAS8. Cet isolat avait à la fois les gènes de l'entérotoxine A et B, et selon **Da Silva et al. (2005)**, la présence de ces deux gènes dans le même isolat augmente sa capacité toxigène. De plus, il était capable de former des biofilms sur le PS et le SS, même sans avoir les gènes *icaA* et *icaD*. Ce résultat confirme la capacité des isolats de *S. aureus* à former des biofilms indépendamment du locus *ica* (**Rode et al., 2007**).

Par ailleurs et en examinant la résistance aux antimicrobiens, il a été constaté que la résistance aux bêta-lactames (pénicilline et ampicilline) prédominait parmi les isolats, suivie des tétracyclines (tétracycline), des macrolides (érythromycine) et des sulfamides. Tous les isolats étaient résistants à au moins un agent antimicrobien. La résistance à la pénicilline et à l'ampicilline est la plus élevée chez *S. aureus* et peut atteindre des fréquences supérieures à 70% (**Unakal et Kaliwal, 2010**). Dans cette étude, le niveau de résistance à ces antimicrobiens était de 66,6 %. Aussi, il a été observé que 8,4% des isolats étaient multi-résistants à l'érythromycine, la tétracycline, l'ampicilline et la pénicilline. **Tan et al. (2014)** ont évalué *S. aureus* isolé des mains des manipulateurs et ont trouvé des niveaux de résistance à l'ampicilline et à la pénicilline, ainsi qu'un faible niveau de multi-résistance (5,41%), similaire à celui obtenu dans cette étude.

Par conséquent, les niveaux de résistance trouvés dans cette étude peuvent être s'expliquer par l'utilisation indiscriminée d'antimicrobiens chez l'homme pour traiter des maladies, ce qui est une tendance inquiétante, car ces isolats possèdent la capacité de former des biofilms. Dans certaines circonstances, telles que celles rencontrées lors de la formation de biofilm, les bactéries peuvent rencontrer des doses sub-létales d'antibiotiques, contribuant ainsi à l'émergence d'isolats résistants.

Pour conclure cette discussion les auteurs rapportent avoir trouvé *S. aureus* parmi les isolats de CPS provenant de bonbons faits à la main produits à Pelotas, au Brésil. Les isolats avaient

un potentiel de virulence, puisque la moitié d'entre eux étaient entérotoxinogènes, porteurs des gènes d'entérotoxines souvent impliqués dans les épidémies d'intoxication alimentaire staphylococcique. De plus, la capacité de tous les isolats à produire des biofilms met en évidence le risque de persistance de ces microorganismes potentiellement virulents dans l'environnement de fabrication des aliments.

Références Bibliographiques

Les références utilisées ciblent bien la thématique du présent article.

Article 2: Antibiotic Susceptibility and Ability to Form Biofilm of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated From Frozen Vegetables. Skowron K., Grudfewska K., Lewandowski D., Gajewski P., Reśliński A., & Gospodarek-komkowska E., 2019. *Acta Alimentaria*, 48 (1):65–75.

Article disponible sur: <https://core.ac.uk/download/pdf/225166119.pdf>

Description de l'étude

Cette étude a comme thème l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques et la capacité à former un biofilm par des souches de *L. monocytogenes* isolées de mélanges de légumes congelés en Pologne, elle a été réalisée par Skowron et ses collaborateurs de l'université Nicolaus Copernicus de Toruń.

Justification du choix de l'article

Le choix de l'article était dû au fait qu'il enveloppe toutes les informations scientifiques en relation avec le thème de notre mémoire puisqu'il traite la formation des biofilms par des bactéries antibio-résistantes d'origine alimentaire.

1. Résumé

Les auteurs ont signalé en premier lieu que *Listeria monocytogenes* constitue une menace sérieuse pour la santé publique, puisque la plupart des cas de listériose sont liés à la consommation d'aliments contaminés. *L. monocytogenes* est souvent détecté à la fois dans les légumes frais et surgelés. D'où la proposition de cette étude qui a pour but d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques et la capacité à former un biofilm par des souches de *L. monocytogenes* isolées de mélanges de légumes congelés en Pologne. D'après les auteurs quatre-vingt-dix-neuf souches génétiquement différentes ont été trouvées parmi 100 isolats de *L. monocytogenes*. Parmi les 99 souches, 80 (80,8%) étaient sensibles à tous les antibiotiques testés. Dix-neuf (19,2 %) souches étaient résistantes à un ou plusieurs antibiotiques. Dans ce groupe de souches de *L. monocytogenes*, la plupart des souches étaient résistantes à l'érythromycine (16; 16,1%), à la pénicilline (15; 15,1%), au méropénème (12; 12,1%), au cotrimoxazole (12; 12,1%) et à l'ampicilline (3; 3,1%). Par ailleurs, des différences quant à l'intensité de biofilm ont été observées entre les isolats, à la fois entre ceux isolés au cours d'années successives et ceux d'une année particulière (une année donnée). L'analyse effectuée a montré corrélation négative et faible, statistiquement

non significative ($r = -0,088$), entre le nombre d'antibiotiques auxquels les souches étaient résistantes et leur intensité de formation de biofilm. A la fin, les auteurs rappellent une nouvelle fois que la contamination des aliments par *L. monocytogenes* constitue une menace pour les consommateurs, et qu'il est donc nécessaire de surveiller leur sensibilité aux antibiotiques, leur capacité à former des biofilms et leur similarité génétique, afin d'évaluer le temps de persistance des souches en usine.

2. Introduction et objectifs

Dans un premier temps, les auteurs ont donné un aperçu sur *L. monocytogenes* comme agent causal de la listériose et l'un des agents pathogènes zoonotiques les plus virulents transmis par les aliments, en rapportant des chiffres sur le nombre de cas humains confirmés en 2015, signalés par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) et qui avait atteint 2206 cas de listériose (soit 0,46 cas pour 100 000 habitants) (EFSA, ECDC, 2016). A propos des modalités de transmission, un exemple est cité et concerne la dernière épidémie de listériose, liée aux légumes, qui a été enregistrée aux États-Unis et au Canada, associée à la consommation de salade conditionnée (Self et al., 2016). Toujours dans le même contexte, il a été signalé que la principale cause de pollution est liée aux utilisations: de fumier de ferme contaminé, pour fertiliser le sol et d'eau contaminée pour laver les fruits et légumes (Szymczak et al., 2014). Dans un second temps, les auteurs ont évoqué la survie chez espèce bactérienne. Ainsi, la capacité de *L. monocytogenes* à survivre dans un large éventail de conditions environnementales et à former un biofilm rend leur éradication difficile. En effet, *L. monocytogenes* forme diverses structures de biofilm, y compris une monocouche de cellules adhérentes, des multicouches plates non structurées et un réseau de chaînes tricotées. Les bactéries formant un biofilm montrent une meilleure capacité à survivre et à résister à divers facteurs environnementaux à la fois chimiques (métaux lourds, acides, agents antibactériens et désinfectants) et physiques (séchage, rayonnement UV) (Bridier et al., 2015). *L. monocytogenes* est naturellement sensible à un large éventail d'antibiotiques. Le niveau de résistance varie selon l'utilisation des antimicrobiens chez les humains et les animaux, ainsi que selon la géographie. Il est très important de surveiller la sensibilité aux antibiotiques de *L. monocytogenes* isolé de différents environnements (Jamali et al., 2013). Cette étude a donc comme but d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques et la

capacité à former un biofilm de souches de *L. monocytogenes* isolées de mélanges de légumes congelés en Pologne.

3. Matériels et méthodes

Le travail expérimental de la présente étude s'est déroulé comme suit: **(i)** échantillonnage et isolement de *L. monocytogenes*, **(ii)** identification des souches par le séquençage de l'ARNr 16S, **(iii)** évaluation de la similarité génétique des souches par la technique RAPD, **(iv)** test de sensibilité aux antibiotiques et **(v)** évaluation de la formation de biofilm. Nous présentons ci-après chacune de ces étapes dans les détails de l'article source.

3.1. Matériel de recherche

Les souches de *L. monocytogenes* ont été isolées à partir d'échantillons de mélanges de légumes congelés (brocoli, carotte, haricots verts, pois verts, maïs, haricots rouges, oignon, poivron rouge et pomme de terre) produits dans une usine de congélation de légumes en Pologne entre 2003-2007 (Tableau I). Chaque année, le même mélange de légumes surgelés est testé. L'homogénat préparé a été testé pour la présence de *L. monocytogenes*, selon la norme PN EN ISO 11290-1. Les isolats obtenus (504) ont été identifiés par PCR et leurs similitudes génétiques ont été évaluées par la technique RAPD (décrite ci-dessous). Deux cent quatre-vingt-huit souches étaient génétiquement différentes. Vingt souches de chaque année ont été utilisées dans l'étude. Ces souches ont été choisies au hasard pour effectuer cette recherche.

Tableau I: Présence de *L. monocytogenes* dans les légumes surgelés.

Année	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons positif	Nombre de souches de <i>L. monocytogenes</i> (génétiquement différent)	Nombre de souches de <i>L. monocytogenes</i> testées
2003	1250	93	44	20
2004	2300	141	62	20
2005	1600	120	96	20
2006	2850	88	67	20
2007	1100	62	19	19
TOTAL		504	288	99

3.2. Identification des souches

L'identification des souches obtenues au niveau de l'espèce a été réalisée par technique de PCR. L'ADN des souches de *L. monocytogenes* testées a été isolé à l'aide du kit Genomic Mini (A&A Biotechnology). Pour déterminer les souches appartenant au genre *Listeria*, deux amorces spécifiques ont été conçues à partir de la séquence d'ARNr 16S (**Border et al., 1990**). Pour identifier les espèces de *L. monocytogenes*, deux amorces supplémentaires ont été conçues sur la base de la séquence du gène codant pour la listériolysine O (hlyA) (**BANSAL, 1996**). La souche de référence *L. monocytogenes* ATCC 19111 a été utilisée comme souche contrôle (témoin).

3.3. Évaluation de la similarité génétique des souches

L'évaluation de la similarité génétique des souches étudiées a été réalisée par la technique RAPD, en utilisant l'amorce OPA-11 avec la séquence: 5'-CAATCGCCGT-3' selon (**Ozbey et al, 2006**). Chaque volume de réaction de 25 µL contenait environ 50 ng d'ADN.

Pour déterminer le degré de similarité génétique entre les isolats, un dendrogramme phylogénétique a été réalisé avec le programme Phoretix 1 DPro (TotalLab). L'analyse de cluster a été réalisée, en utilisant le clustering hiérarchique, par la méthode UPGMA et le coefficient de Dice.

3.4. Test de sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des souches à la pénicilline, à l'ampicilline, au méropénème, à l'érythromycine et au cotrimoxazole a été évaluée par la méthode de diffusion en gélose sur le milieu Mueller Hinton additionné de 5% de sang de cheval et de 20 mg l⁻¹ de NAD (bioMérieux). L'incubation des antibiogrammes et l'interprétation de leurs résultats ont été réalisées conformément aux recommandations de l'EUCAST v. 6.0 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2015).

3.5. Évaluation de la formation de biofilm

La formation de biofilm par *L. monocytogenes* a été évaluée sur une surface de polystyrène, en utilisant du cristal violet comme décrit par **Kwiecińska-Piróg et al (2013)**. Pour chaque souche, les essais ont été réalisés en triple.

L'absorbance (A) a été mesurée au spectrophotomètre BIO-TEK (The Synergy HT Multidetector) à une longueur d'onde de 570 nm et lue à l'aide des logiciels de signature

KC4 v3.4 et KC4. La valeur seuil d'absorbance (T) était la preuve de la formation de biofilm et était définie comme la somme de la moyenne arithmétique du contrôle négatif et d'une valeur triple de son écart type ($T = \bar{x} + 3\delta$). Les souches formatrices de biofilm ont été divisées en 4 catégories, selon la formation de biofilm: faible (A: $T - 1000$), modérément intensive (A: 1001–2000), forte (A: 2001–3000) et très forte ($A \geq 3001$).

3.6. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été soumis à une analyse statistique dans le logiciel STATISTICA 12 PL (StatSoft). La significativité des différences entre la fréquence des profils de résistance aux antibiotiques au cours des années totales et particulières a été vérifiée avec le test post-hoc de Bonferroni ($\alpha = 0,05$). De plus, la significativité des différences entre la valeur de l'absorbance pour les souches des années successives a été vérifiée, en utilisant le test de Bonferroni post-hoc ($\alpha = 0,05$). L'existence d'une corrélation entre le niveau de résistance aux antibiotiques des souches étudiées et leur capacité à former des biofilms sur microplaques a été vérifiée et interprétée selon l'échelle de Stanisiz (**Stanisz, 1998**).

4. Résultats et discussion

Dans le présent article, les sections "résultats & discussion" sont combinées. Les résultats sont illustrés par des figures et des tableaux et amplement décrits. Cette section sera présentée tel qu'elle a été publiée par les auteurs. La discussion est intéressante, en comparant les résultats obtenus à d'autres études similaires. Par ailleurs et pour une présentation plus claire de cette section combinée, des titres ont été proposés à chaque tranche de résultats.

4.1. Identification moléculaire et détermination de la similarité génétique

Les auteurs affirment que la plupart des cas de listériose sont liés à la consommation d'aliments contaminés, cela représente alors une menace sérieuse pour la santé publique. Dans cette étude et selon l'année, *L. monocytogenes* a été trouvée dans 3,1 à 7,5% des échantillons de légumes congelés (Tableau I). Les auteurs ont cité des travaux ayant publié sur la présence de *L. monocytogenes* dans légumes, notamment ceux de (**Garcia Gimno et al., 1996**; **Kordowska-wiater et al., 2007**) qui ont montré la présence de *L. monocytogenes* dans 30,0 % et 10,3 % d'échantillons de légumes, respectivement. **Szymczak et al. (2014)** ont isolé *L. monocytogenes* à partir d'échantillons de fraises (10,0 %), de pommes de terre (15,0

%) et de persil (5,0 %). Cependant, dans les études de (Vitas et al., 2004; Aguado et al., 2004), le pourcentage de présence de *L. monocytogenes* dans les légumes surgelés était beaucoup plus faible et avec un niveau de 1,8% et 1,2%, respectivement.

Tous les isolats considérés dans la présente étude appartenaient à l'espèce *L. monocytogenes*, après une confirmation par PCR. L'occurrence de 99 souches a été observée parmi 100 isolats classés dans l'espèce *L. monocytogenes*, dont l'un comprenait deux isolats génétiquement identiques, marqués 75 et 138, tous deux de 2005 (Figure 1). Tous les isolats étudiés ont été classés en deux principaux groupes monophylétiques. Le premier groupe incluait 68 (68,0%) souches et le second 30 (30,0%) souches (Figure 1). Une exception a concerné la souche n° 3 de 2007 qui n'a pu être classée dans aucun des groupes (Figure 1).

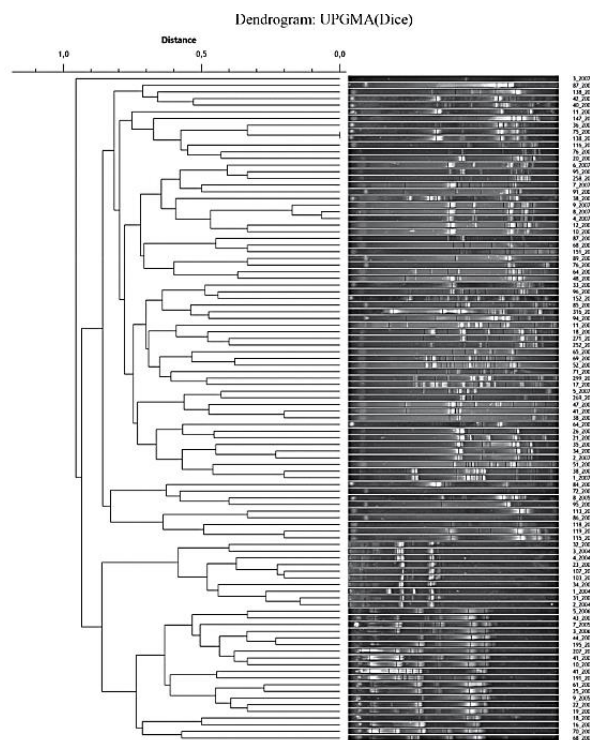


Figure 1. Dendrogramme des isolats étudiés de *L. monocytogenes* (n=100).

4.2. Sensibilité et résistance aux antibiotiques

L'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *L. monocytogenes* a permis de distinguer 9 profils (Tableau II). Ainsi, sur les 99 souches, 80 (80,8%) appartenaient au profil A, et elles sont sensibles à tous les antibiotiques testés. Seulement, 19,1% des souches examinées dans cette étude présentaient une résistance à au moins un des cinq antibiotiques évalués. La résistance à l'érythromycine et à la pénicilline a été la plus

fréquemment observée, parmi le groupe test (n = 16,2% et 15,2%, respectivement). Des résultats similaires ont été obtenus par **Ruiz-Bolivar et al. (2011)**, selon lesquels le pourcentage de souches résistantes à la pénicilline était de 16,0 %. Dans cette étude, la résistance des souches aux: méropénème, cotrimoxazole et ampicilline a été reportée à 12 (12,1 %), 12 (12,1 %) et 3 (3,0 %), respectivement (Tableau II).

Tableau II: Profils de résistance aux antibiotiques des souches étudiées de *L. monocytogenes* (n=99).

profile	Résistance aux antibiotiques		NDS	Nombre de souches isolées chaque année				
				2003	2004	2005	2006	2007
A	S: P, AM, MEM, E, SXT	R: ---	80**	18 ^a	19 ^a	16 ^a	19 ^a	8 ^b
B	S: AM	R: P, MEM, E, SXT	9*	1 ^a		1 ^a		7 ^b
C	S: P, AM, MEM, SXT	R: E	3*			2		1
D	S: MEM	R: P, AM, E, SXT	1*		1			
E	S: AM, MEM, SXT	R: P, E	2*					2
F	S: AM, SXT	R: P, MEM, E	1*					1
G	S: P, MEM, E, SXT	R: AM	1*	1				
H	S: E, SXT	R: P, AM, MEM	1*				1	
I	S: AM, E, SXT	R: P, MEM	1*					1
Total			99	20	19	20	20	20

*: nombre de souches représentant le profil donné marqué d'un nombre différent d'astérisques diffère statistiquement et significativement ($P \leq 0,05$). a; b: nombre de souches représentant le profil donné dans des années particulières marquées par des lettres statistiquement et significativement différentes ($P \leq 0,05$). S: sensible; R: résistant; AM: ampicilline; P: pénicilline; MEM: méropénème; E: érythromycine; SXT: cotrimoxazole. **NDS** : Nombre de Souches.

En effet, diverses résistances aux antibiotiques ont été observées au cours des différentes années, où le pourcentage le plus élevé des souches résistantes a été observé en 2007. Cependant, du fait que seulement 20 souches ont été testées chaque année, il ne peut être clairement établi que la résistance aux antibiotiques a augmenté parmi les souches de *L. monocytogenes* au cours de la période de recherche. **Morvan et al. (2010)** ont montré des différences considérables dans les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) entre les souches isolées chez l'homme en 1926 et les souches isolées en 2007. La comparaison de chacune des périodes couvertes par l'étude montre que la valeur de la CMI₅₀ pour l'ampicilline a plus que doublé entre 2005 et 2007 (CMI₅₀=0,5 g ml⁻¹) par rapport aux années 1926–1989 (CMI₅₀=0,19 g ml⁻¹). Des valeurs de CMI₅₀ accrues ont également été

indiquées pour la pénicilline. La surveillance de la résistance à l'ampicilline est un élément important dans l'éradication de ces microorganismes.

4.3. Formation de biofilm

Toutes les souches de *L. monocytogenes* étudiées ont formé un biofilm, dont 42 (42,4%) des souches étaient catégorisées très forte, 21 (21,2%) forte, 28 (28,3%) modérément intensive et 8 (8,1%) faible formatrice de biofilm (Figure2).

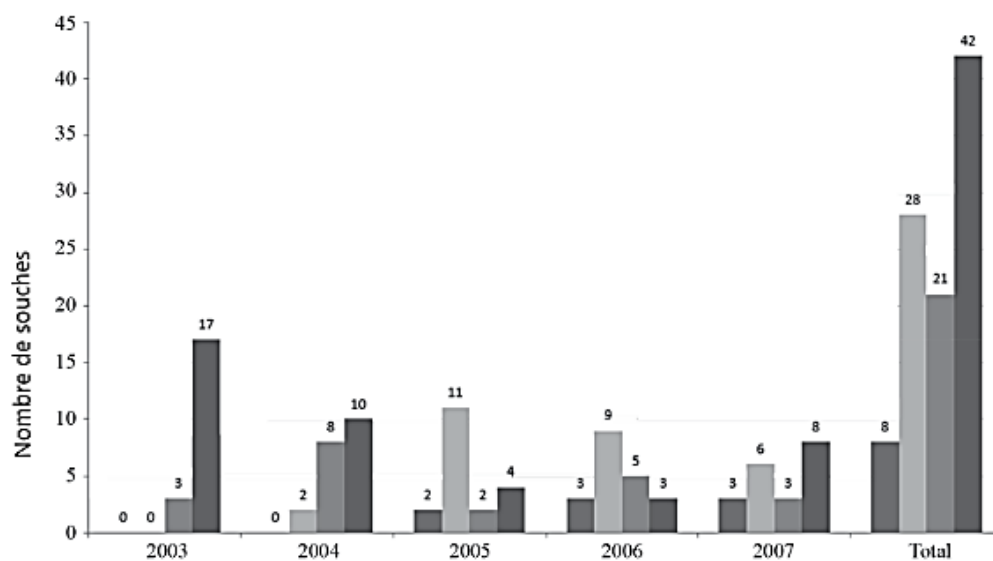


Figure 2. Intensité de formation de biofilm par les souches de *L. monocytogenes* au cours des années individuelles.

■ faible ■ modéré ■ fort ■ très fort

Les biofilms les plus intenses (valeur moyenne d'absorbance – 3,479, Fig. 3) ont été formés par des souches de *L. monocytogenes* isolées en 2003. Cette valeur était statistiquement significativement plus élevée ($P \leq 0,05$) que celle déterminée pour les souches des années 2005– 2007 (Fig. 3). La valeur moyenne d'absorbance la plus faible (1,846) a été indiquée pour les souches de *L. monocytogenes* de 2006. Cette valeur était statistiquement significativement inférieure ($P \leq 0,05$) à celle déterminée pour les souches des années 2003-2004 (Fig. 3). Dans les études menées par (Harvey et al., 2007; Doijad et al., 2015), la plupart des souches ont formé un biofilm faible ou modérément intensif, seulement 26,5%

et 5,0% des souches isolées des aliments ont formé un biofilm fort, respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus par **Meloni et al. (2012)** et **Barbosa et al. (2013)** qui ont classé la plupart des souches de *L. monocytogenes* isolées des aliments et des surfaces en contact avec les aliments, comme des souches formant un biofilm faible ou modérément intensif.

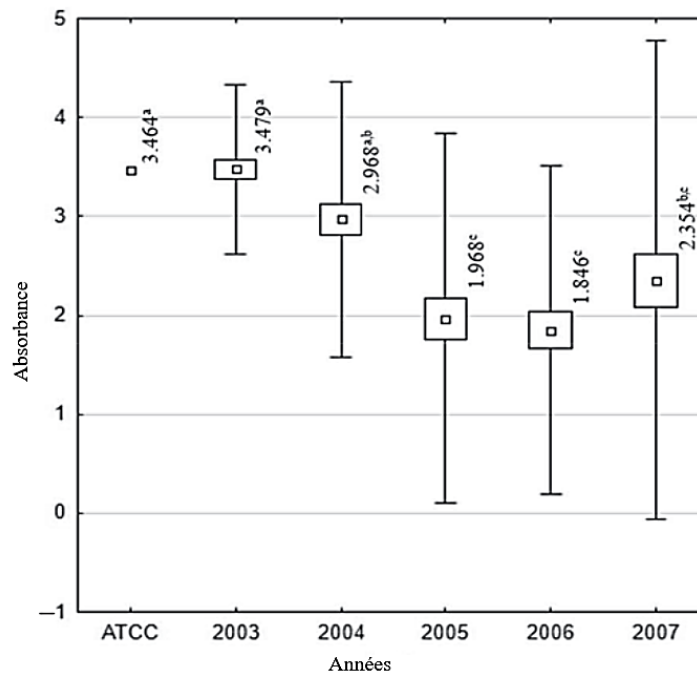


Figure 3. Signification statistique des différences dans la capacité à former un biofilm par les souches de *L. monocytogenes* isolées au cours des années successives.

□: Moyenne; □: moyenne +/- erreur standard; I: Moyenne +/- 2 Ecart type.

Certaines différences dans la capacité à former du biofilm ont été observées parmi les souches de *L. monocytogenes* isolées au cours d'années particulières, pour lesquelles la similarité génétique était d'au moins à 80,0% (Fig. 1, Tableau III). Des valeurs similaires d'absorbance ont été obtenues pour les souches n° 23 et 107 et n° 1 et 33 isolés en 2004, ainsi que les souches n° 8 et 9 de 2007 (Tableau III). Pour les souches génétiquement similaires, n° 1 et 38 de 2007, une différence significative a été indiquée dans l'intensité de formation du biofilm, les valeurs d'absorbance étaient respectivement de 1,305 et 4,177 (Tableau III).

Tableau III: Différences d'intensité de formation de biofilm par les souches étudiées de *L. monocytogenes* (n=99).

souches	2003			souches	2004			souches	2005		
	AM	STD	CV%		AM	STD	CV%		AM	STD	CV%
38/2003	3.487	0.285	8.17	1/2004	3.587	0.272	7.57	7/2005	1.908	0.164	8.61
41/2003	2.881	0.096	3.35	2/2004	3.508	0.192	5.46	8/2005	1.433	0.054	3.73
47/2003	3.283	0.217	6.59	3/2004	2.911	0.212	7.29	9/2005	3.756	0.098	2.61
48/2003	3.637	0.270	7.42	4/2004	2.873	0.659	22.95	11/2005	1.382	0.202	14.59
51/2003	3.323	0.488	14.69	23/2004	3.673	0.083	2.25	18/2005	2.670	0.068	2.55
52/2003	3.918	0.224	5.71	31/2004	3.193	0.276	8.65	36/2005	3.999	0.072	1.79
64/2003	3.673	0.440	11.98	32/2004	3.299	0.433	13.11	38/2005	1.141	0.186	16.27
65/2003	4.177	0.170	4.07	33/2004	3.583	0.203	5.67	40/2005	3.518	0.095	2.70
68/2003	3.149	0.336	10.66	34/2004	3.802	0.123	3.22	41/2005	0.992	0.068	6.81
69/2003	3.475	0.247	7.12	103/2004	2.528	0.332	13.12	42/2005	1.302	0.107	8.20
71/2003	3.499	0.207	5.91	107/2004	3.505	0.065	1.85	43/2005	1.687	0.145	8.60
72/2003	3.600	0.244	6.78	113/2004	1.278	0.074	5.83	44/2005	1.627	0.102	6.27
76/2003	4.258	0.158	3.72	115/2004	2.032	0.030	1.48	64/2005	1.908	0.076	3.97

Tableau III: Suite

souches	2003			souches	2004			souches	2005		
	AM	STD	CV%		AM	STD	CV%		AM	STD	CV%
85/2003	2.786	0.339	12.16	116/2004	2.604	0.112	4.28	75(138)/2005	1.501	0.082	5.34
86/2003	3.497	0.404	11.55	118/2004	2.993	0.063	2.10	84/2005	0.879	0.063	7.14
87/2003	3.502	0.319	9.10	119/2004	3.577	0.120	3.36	152/2005	1.812	0.136	
89/2003	3.607	0.225	6.24	138/2004	2.514	0.059	2.33	191/2005	2.056	0.074	7.51
91/2003	3.271	0.165	5.04	147/2004	1.674	0.049	2.93	195/2005	1.686	0.063	3.59
94/2003	2.586	0.201	7.79	151/2004	3.303	0.098	2.97	207/2005	3.010	0.065	3.74
95/2003	3.968	0.157	3.95	316/2004	2.931	0.113	3.85	–	–	–	–
CN	0.084	0.011	13.26	CN	0.084	0.011	13.26	CN	0.084	0.011	13.26

Tableau III: Suite

souches	2006			souches	2007		
	AM	STD	CV%		AM	STD	CV%
3/2006	0.955	0.065	6.85	1/2007	1.305	0.146	11.15
5/2006	3.235	0.072	2.23	2/2007	3.304	0.182	5.52
10/2006	2.351	0.241	10.24	3/2007	1.549	0.101	6.50
16/2006	3.449	0.240	6.95	4/2007	1.305	0.125	9.60
19/2006	3.428	0.263	7.67	5/2007	2.159	0.066	3.04
22/2006	1.599	0.194	12.12	6/2007	1.425	0.139	9.77
25/2006	2.279	0.082	3.59	7/2007	0.619	0.194	31.36
41/2006	0.984	0.125	12.67	8/2007	0.620	0.053	8.49
61/2006	2.361	0.223	9.43	9/2007	0.690	0.091	13.21
68/2006	1.214	0.120	9.89	10/2007	1.171	0.122	10.41
70/2006	1.336	0.209	15.64	11/2007	1.842	0.046	2.50
76/2006	2.231	0.112	5.03	12/2007	2.717	0.065	2.38
87/2006	1.214	0.234	19.26	17/2007	3.487	0.285	8.17
95/2006	1.718	0.227	13.23	18/2007	2.881	0.096	3.35
96/2006	1.398	0.027	1.92	20/2007	3.283	0.217	6.59
252/2006	1.140	0.290	25.40	21/2007	3.637	0.270	7.42
258/2006	1.380	0.135	9.81	26/2007	3.323	0.488	14.69
269/2006	2.414	0.109	4.52	34/2007	3.918	0.224	5.71
271/2006	0.777	0.100	12.84	35/2007	3.673	0.440	11.98
299/2006	1.458	0.064	4.40	38/2007	4.177	0.170	4.07
CN	0.084	0.011	13.26	CN	0.084	0.011	13.26

AM: valeur moyenne de l'absorbance; STD: écart type; CV: coefficient de variation; CN: Contrôle négatif.

L'analyse réalisée par les auteurs a permis de déterminer une faible corrélation négative statistiquement non significative ($P=0,380$) ($r = -0,088$) entre le nombre d'antibiotiques auxquels les souches étudiées étaient résistantes et l'intensité de la formation de biofilm par celles-ci (absorbance) (Figure 4). En conséquence, parmi les souches étudiées, il y avait une très faible tendance à une diminution de l'intensité de la formation de biofilm, avec une augmentation de leur résistance aux antibiotiques. D'autres auteurs ont également corrélié la production de biofilm à la résistance aux antibiotiques et ont observé un schéma similaire à celui de la présente étude (Atray et Atray, 2015; Neupane et al., 2016; Zakiet al., 2017).

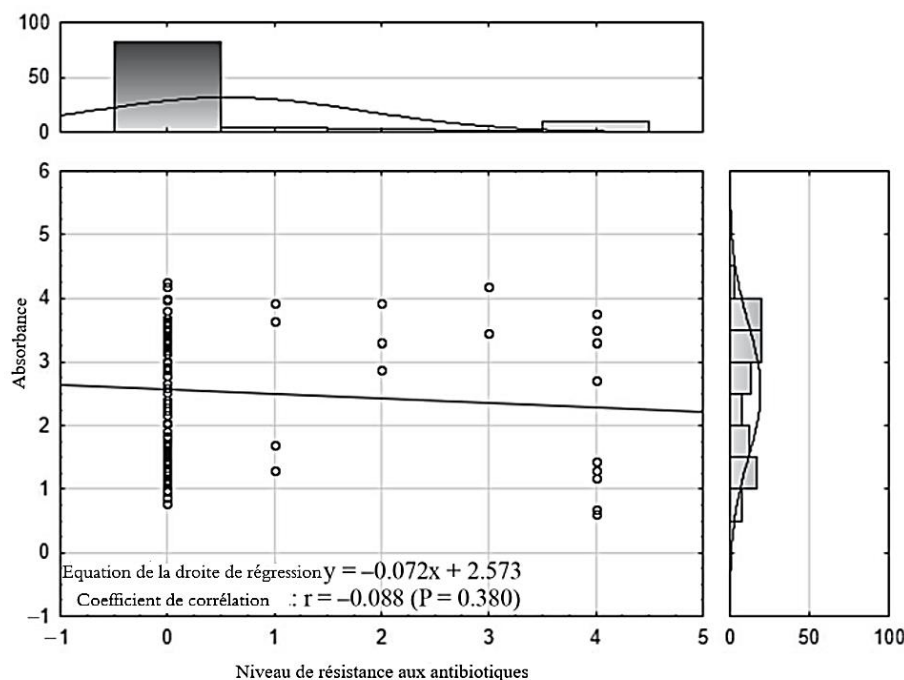


Figure 4. Relation entre l'intensité de formation de biofilm et la sensibilité aux antibiotiques des souches de *L. monocytogenes*.

5. Conclusion

En conclusion, cette étude a montré que les légumes congelés en Pologne peuvent être contaminés par *L. monocytogenes*. La plupart des souches étudiées étaient sensibles aux antibiotiques, mais certaines souches étaient résistantes à la pénicilline, au méropénème, à l'érythromycine et au cotrimoxazole. De plus, parmi les souches étudiées, il y avait une tendance très faible à une diminution de l'intensité de la formation de biofilm avec une augmentation de leur résistance aux antibiotiques. La présence de *L. monocytogenes* dans la production alimentaire constitue une menace pour les consommateurs. Par conséquent, il

est nécessaire de surveiller en permanence leur sensibilité aux antibiotiques, d'évaluer la capacité à former des biofilms et la similarité génétique, afin d'évaluer la persistance des souches.

6. Références Bibliographiques

Les références sont variées et en étroite relation avec la thématique de l'étude.

- Conclusions générales et comparaison possible entre les deux publications -

Les espèces bactériennes citées dans les deux études sont différentes, mais, elles ont été abordées pour trois aspects communs, à savoir: l'origine alimentaire, la résistance aux antibiotiques, et la capacité de formation de biofilm. Les espèces *S. aureus* et *L. monocytogenes* sont connues par leur pathogénicité, mais en développant de nouvelles capacités, telles que la résistance aux antibiotiques et la formation de biofilm, elles deviennent une vraie menace et un danger de santé publique, en particulier, pour les souches d'origine alimentaire.

Dans les deux articles et pour chacune des espèces étudiées, les aliments en question étaient différents ainsi que la zone géographique où le problème était exposé à l'étude. **Kroning et al. (2016)** ont traité la présence de *S. aureus* dans les bonbons faits à la main à Pelotas (Brésil). Alors que **Skowron et al. (2019)** ont étudié la présence de *L. monocytogenes* dans des mélanges de légumes congelés, en Pologne. Les deux études ont signalé avoir trouvé des souches antibio-résistantes et ce à partir des deux types d'aliments. De même, l'existence d'isolats avec une capacité de formation de biofilm a été mentionnée. Partant du principe que les bactéries sont dotées de grandes capacités d'adaptations et quels que soient les résultats obtenus par les deux études; le problème de la résistance aux antibiotiques associé à la formation de biofilm par des bactéries d'origine alimentaire est réel. Il devrait être pris en considération pour éviter une pandémie d'antibio-résistance liée à la persistance de telles bactéries dans les environnements alimentaires.

Conclusion

Conclusion

Ce travail bibliographique a mis le point non seulement sur le danger relatif à la présence d'éléments d'anbio-résistances (bactéries ou gènes) dans les aliments, mais aussi sur les mécanismes biologiques conférant la persistance à ces éléments, notamment la formation de biofilms.

Il est à noter que la résistance aux antimicrobiens ainsi que la formation de biofilms deviennent un problème croissant et insoluble dans le secteur de la santé et de la sécurité alimentaire. Les bactéries formant un biofilm sont enfermées dans une matrice qui leur permet d'exclure les antibiotiques et la réponse immunitaire de l'hôte (**Abebe, 2020**).

De nombreux travaux scientifiques ont signalé la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans différents produits alimentaires, avec la mise en évidence de certains mécanismes sous-jacents corrélés à la résistance, en particulier la formation de biofilms. Parmi ces travaux, ceux de **Kroning et al., 2016** et **Skowron et al., 2019**.

L'étude de **Skowron et al., 2019** a montré que les légumes congelés en Pologne peuvent être contaminés par *L. monocytogenes*. Leurs résultats ont rapporté que parmi les souches retenues, certaines sont résistantes à la pénicilline, au méropénème, à l'érythromycine et au cotrimoxazole. Les souches étudiées sont aussi capables à former des biofilms. Par ailleurs, les résultats quant à la corrélation entre la résistance aux antibiotiques et la formation de biofilms ne sont pas vraiment concluants.

Kroning et al., 2016 ont isolé et identifié des staphylocoques à coagulase positive à partir de bonbons faits à la main produits à Pelotas (Brésil). Le potentiel de virulence a été vérifié en évaluant la présence des gènes d'entérotoxine staphylococcique, *icaA* et *icaD*, le potentiel de formation de biofilm et la résistance antimicrobienne des isolats. La majorité des isolats portaient les gènes *icaA* et *icaD* et certains d'entre eux avaient les gènes codant pour les entérotoxines A et B. La majorité des isolats, étaient résistants à au moins un des antimicrobiens testés et une multi-résistance a été observée dans 8,4 % des isolats. Les isolats avaient un potentiel de virulence et la moitié d'entre eux étaient entérotoxigènes. La capacité de tous les isolats à produire des biofilms met en évidence le danger que

représentent ces microorganismes potentiellement virulents persistants dans les environnements de fabrication alimentaire.

Les deux études ont révélé la présence d'espèces bactériennes pathogènes comme *S. aureus* et *L. monocytogenes* dans les aliments, ce qui constitue une menace pour la santé publique, en particulier, avec une capacité de formation de biofilms, synonyme de persistance.

Références Bibliographiques

- **Aarestrup F.M., 2005.** Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **96**: 271–281.
- **Aarestrup F.M., Wegener H.C., & Collignon P., 2008.** Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, **6(5)**: 733-50.
- **Abass A., Adzitey F., & Huda N., 2020.** *Escherichia coli* of Ready-to-Eat (RTE) Meats Origin Showed Resistance to Antibiotics Used by Farmers. *Antibiotics*, **9(12)**: 869.
- **Abdallah M., Benoliel C., Drider D., Dhulster P., & Chihab N.E., 2014.** Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, **196**: 453–472.
- **Abebe G.M., 2020.** The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *International Journal of Microbiology*, **2020**: 1705814.
- **Abisado R.G., Benomar S., Klaus J.R., Dandekar A.A., & Chandler J.R., 2018.** Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *mBio*, **9(3)**: 02331-17.
- **Adzitey F., Ekli R., Abu A., & Yildiz F., 2019.** Prevalence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from raw and grilled beef in Nyankpala community in the Northern Region of Ghana. *Cogent food & agriculture*, **5**: 1671115.
- **Al Bayssari C., Dabboussi F., Hamze M., & Rolain J.M., 2015.** Emergence of carbapenemase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacterbaumannii* in livestock animals in Lebanon. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**: 950–951.
- **Alam S.B., Mahmud M., Akter R., Hasan M., Sobur A., Nazir N.H., Noreddin A., Rahman T., El Zowalaty M.E., & Rahman M., 2020.** Molecular detection of multidrug resistant *Salmonella* species isolated from broiler farm in Bangladesh. *Pathogens*, **9**: 201.
- **Alanis A.J., 2005.** Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. *Archives of medical research*, **36(6)**: 697-705.
- **Alav I., Stutton J. M. & Rahman K. M., 2018.** Role of Bacterial Efflux Pumps in Biofilm Formation. *Journal of Antimicrobial Therapy*, **73(8)**: 2003-2020.
- **Allen H.K., Donato 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.
- **Altahi A.D., Gherbawy Y.A., & Hassan S.A., 2010.** Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from retail raw chicken meat in Taif, Saudi Arabia. *Foodborne pathogens and disease*, **7(3)**: 281-5.
- **Álvarez-Fernández E., Cancelo A., Díaz-Vega C., Capita R., & Alonso-Calleja C., 2013.** Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: A comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods. *Food Control*. **30 (1)**: 227-234.
- **Amyes S. G. B., 2010.** Antibacterial Chemotherapy Theory, Problems and Practice. Oxford University Press; 1st edition. 80p.
- **Andrews J.M., 2001.** Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **48(suppl. S1)**: 5-16.
- **Armbruster C.R., & Parsek R.M., 2018.** New insight into the early stages of biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115(17)**: 4317-4319.
- **Baceiro A., Tomás M., & Bou G., 2013.** Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clinical microbiology Review*, **26(2)**: 185-230.

- **Balasubramanian S., Hurley L.H., & Neidle S., 2011.** Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, **10(4)**: 261-75.
- **Balcázar J.L., Subirats J., & Borrego C.M., 2015.** The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, **31(6)**: 1216.
- **Balemi A., Gumi B., Amenu K., Girma S., Gebru M., Tekle M., Ríus A.A., D'Souza D.H., Agga G.E., & Dego O.K., 2021.** Prevalence of Mastitis and Antibiotic Resistance of Bacterial Isolates from CMT Positive Milk Samples Obtained from Dairy Cows, Camels, and Goats in Two Pastoral Districts in Southern Ethiopia. *Animals (Basel)*, **11(6)**: 1530.
- **Bandyopadhyay S., & Samanta I., 2020.** Antimicrobial Resistance in Agri-Food Chain and Companion Animals as a Re-emerging Menace in Post-COVID Epoch: Low-and Middle-Income Countries Perspective and Mitigation Strategies. *Frontiers in Veterinary science*, **7**: 620.
- **Becker D., E., 2013.** Antimicrobial Drugs. *Anesthesia Progress*, **60(3)**: 111–123.
- **Bennani H., Pereira Mateus A.L., Eastmure E., Stärk K.D.C., & Häsler B., 2020.** Overview of Evidence of Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in the Food Chain. *Antibiotics*, **9(2)**:49.
- **Bennett J. W., 2015.** What is an Antibiotic? In: **Sánchez S., & Demain A., L. 2015.** Antibiotics Current Innovations and Future Trends. Eds. Caister Academic Press. 480p.
- **Bintsis T., 2018.** Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, **4(4)**: 665-684
- **Blair J.M.A., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., & Piddock L.J.V., 2015.** Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, **13**: 42-51.
- **Bottery M.J., Pitchford J.W., & Friman V.P., 2021.** Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. *The ISME Journal*, **15**: 939–948.
- **Butt A., & Khan A., 2015.** Antibiotics Resistance of Bacterial Biofilms. *Middle East Journal of Business*, **10**:38-45.
- **Cabello F.C., 2006.** Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, **8(7)**: 1137-44.
- **Cappitelli F., Polo A., & Villa F., 2014.** Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled. *Food Engineering Reviews*, **(6)**: 29–42.
- **Carattoli A., 2001.** Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, **32(34)**: 243-59.
- **Carattoli A., 2013.** Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, **303(6-7)**: 298-304.
- **Carrascosa C., Raheem D., Ramos F., Saraiva A., & Raposo A., 2021.** Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **18(4)**: 2014.
- **Castellano P., Ibarreche M.P., Massani M.B., Fontana C., Vignolo G.M., 2017.** Strategies for Pathogen Biocontrol Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites: A Focus on Meat Ecosystems and Industrial Environments. *Microorganisms*, **5(3)**: 38.
- **Castro-Vargas R.E., Herrera-Sánchez M.P., Rodríguez-Hernández R., & Rondón-Barragán I.S., 2020.** Antibiotic resistance in *Salmonella spp.* isolated from poultry: A global overview. *Veterinary World*, **13(10)**: 2070–2084.

- Chajeka-Wierzchowska W., Zadernowska A., & Łaniewska-Trokenheim Ł., 2016. Diversity of antibiotic resistance genes in *Enterococcus* strains isolated from ready-to-eat meat products. *Journal of Food Science*, **81(11)**: M2799-M2807.
- Chang Q., Wang W., Regev-Yochay G., Lipsitch M., & Hanage W.P., 2015. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be?. *Evolutionary Application*, **8(3)**: 240–247.
- Chattopadhyay M.K., 2014. Use of antibiotics as feed additives: a burning question. *Frontiers In Microbiology*, **5**: 334.
- Chen Q.L., Cui H.L., Su J.Q., Penuelas J., Zhu Y.G., 2019. Antibiotic Resistomes in Plant Microbiomes. *Trends in Plant Science*, **24(6)**: 530-541.
- Christie P.J., 2016. The mosaic type IV secretion systems, *EcoSal Plus*, **7**: 10-1128.
- Coculescu B.I., 2009. Antimicrobial resistance induced by genetic changes. *Journal of Medicine and Life*, **2**: 114-123.
- Cooper R.M., Tsimring L., & Hasty J., 2017. Inter-species population dynamics enhance microbial horizontal gene transfer and spread of antibiotic resistance. *eLife*, **6**: 25950.
- Coughlan L.M., Cotter P.D., Hill C., & Alvarez-Ordóñez A., 2016. New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Frontiers in Microbiology*, **7**: 1641.
- Culyba M.J., Mo C.Y., & Kohli R.M., 2015. Targets for Combating the Evolution of Acquired Antibiotic Resistance. *Biochemistry*, **54**: 3573-3582.
- da Silva A.C., Rodrigues M.X., & Silva N.C.C., 2020. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food and the prevalence in Brazil: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, **51(1)**: 347-356.
- Davies J., & Davies D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **74**: 417-433.
- De Oliveira D.M.P., Forde B.M., Kidd T.J., Harris P.N.A., Schembri M.A., Beatson S.A., Paterson D.L., & Walker M.J., 2020. Antimicrobial Resistance in *ESKAPE* Pathogens. *Clinical Microbiology Review*, **33(3)**: 00181-19.
- Donlan R. M., & Costerton J.W., 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, **15(2)**: 167-193.
- Dowling A., Dwyer J.O., & Adley, C. C., 2017. Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance. In *Antimicrobial Research: Novel Bioknowledge and Educational Programs*; Méndez-Vilas, A., Ed.; University of Limerick: Limerick, Ireland.
- Dsani E., Afari E.A., Danso-Appiah A., Kenu Ernest., Benduri K., & Egyir B., 2020. Antimicrobial resistance and molecular detection of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolates from raw meat in Greater Accra region, Ghana. *BMC Microbiology*. **20(1)**: 253.
- Dweba C.C., Zishiri O.T., & El Zowalaty M.E., 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: livestock-associated, antimicrobial, and heavy metal resistance. *Infection and Drug Resistance*, **(11)**: 2497-2509.
- Estrela S., & Brown S.P., 2018. Community interactions and spatial structure shape selection on antibiotic resistant lineages. *PLoS Computational Biology*, **14(6)**: 1006179.
- Ewnetu D., & Mihret A., 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from humans and chickens in Bahir Dar, Ethiopia. *Foodborne Pathogens and Disease*, **7**: 667–670.

- **Ferron A., 1992.** Bactériologie médicale: à l'usage des étudiants en médecine, Eds. C&R. France, 472p.
- **Fischer J., Rodríguez I., Schmoeger S., Friese A., Roesler U., Helmuth R., & Guerra B., 2012.** *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67(7)**: 1793–1795.
- **Flemming H.C., Neu T.R., & Wozniak D.J., 2007.** The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *Journal of Bacteriology*, **189(22)**: 7945-7.
- **Foster T.J., 2017.** Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Review*, **41(3)**: 430-449.
- **Founou L.L., Founou R.C., & Essack S.Y., 2016.** Antibiotic Resistance in the Food Chain: A developing country-perspective. *Frontiers in Microbiology*, **7**: 1881
- **Galié S., García-Gutiérrez C., Miguélez E.M., Villar C.J., & Lombó F., 2018.** Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Frontiers in Microbiology*, **9**: 898.
- **Gehring R., & Riviere J.E., 2013.** Limitations of MIC as the sole criterion in antimicrobial drug dosage regimen design: the need for full characterization of antimicrobial pharmacodynamic profile especially for drug-resistant organisms. *The Veterinary Journal*, **198(1)**: 15-8.
- **Giaouris E., Heir E., Hébraud M., Chorianopoulos N., Langsrud S., Møretrø T., Habimana O., Desvaux M., Renier S., & Nychas G.J., 2014.** Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, **97(3)**: 298-309.
- **Gilbert P., Allison D.G., & McBain A.J., 2002.** Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, **92**: 98S-110S.
- **Golob M., Pate M., Kušar D., Dermota U., Avberšek J., Papić B., & Zdovc I., 2019.** Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from Humans and Retail Red Meat. *BioMed Research International*, **2019(11)**: 1-12.
- **Goltermann L., & Tolker-Nielsen T., 2017.** Importance of the Exopolysaccharide Matrix in Antimicrobial Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Aggregates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61(4)**: 02696-16.
- **González-Gutiérrez M., García-Fernández C., Alonso-Calleja C., & Capita R., 2020.** Microbial load and antibiotic resistance in raw beef preparations from northwest Spain. *Food Science & Nutrition*, **8**: 777–785.
- **Gounadaki A.S., Skandamis P.N., Drosinos E.H., & Nychas G.J., 2008.** Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages. *Food Microbiology*, **25**: 313–323.
- **Gupta P. D., & Birdi T.J., 2017.** Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, **8(4)**: 266-275.
- **Gupta S.K., Sharma P., McMillan E.A., Jackson C.R., Hiott L.M., Woodley T., Humayoun S.B., Barret J.B., Frye J.G., & McClelland M., 2019.** Genomic comparison of diverse *Salmonella* serovars isolated from swine. *PLoS One*, **14(11)**: 0224518.
- **Gutiérrez D., Delgado S., Vázquez-Sánchez D., Martínez B., Cabo M.L., Rodríguez A., & García P., 2012.** Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**: 8547–8554.

- Guzmán-Soto I., McTiernan C., Gonzalez-Gomez M., Ross A., Gupta Keshav., Suuronen E.J., Mah T.F., Griffith M., & Alarcon E.I., 2021. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. *iScience*, **24(5)**: 102443.
- Ha D.G., & O'Toole G.A., 2015. ci-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa*. *Review Microbiology Spectrum*, **3(2)**: 10
- Haulisah N.A., Hassan L., Bejo S.K., Jajere S.M., & Ahmad N.I., 2021. High Levels of Antibiotic Resistance in Isolates From Diseased Livestock. *Frontiers in veterinary science*, **8**: 652351.
- Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., & Ciofu O., 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **35(4)**: 322-32.
- Hollenbeck B.L., & Rice L.B., 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*, **3(5)**: 421-33.
- Igbinosa E.O., & Beshiru A., 2019. Antimicrobial Resistance, Virulence Determinants, and Biofilm Formation of *Enterococcus* Species from Ready-to-Eat Seafood. *Frontiers in Microbiology*, **10**: 728.
- Impey R.E., Hawkins D.A., Sutton J.M., & da Costa T.P.S., 2020. Overcoming Intrinsic and Acquired Resistance Mechanisms Associated with the Cell Wall of Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel)*. **9(9)**: 623.
- Jeddi M.Z., Yunesian M., Gorji M.E., Noori N., Pourmand M.R., & Khaniki G.R.J., 2014. Microbial Evaluation of Fresh, Minimally-processed Vegetables and Bagged Sprouts from Chain Supermarkets. *Journal of Health Population and Nutrition*, **32(3)**: 391–399.
- Jubeh B., Breijyeh Z., & Karaman R., 2020. Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches. *Molecules*, **25(12)**: 2888.
- Kim M.K., Zhao A., Wang A., Brown Z.Z., Muir T.W., Stone H.A., & Bassler B.L., 2017. Surface-attached molecules control *Staphylococcus aureus* quorum sensing and biofilm development. *Nature Microbiology*, **2**: 17080.
- Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., & Hultgren S.J., 2013. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **3(4)**: 010306.
- Kowalska-Krochmal B., & Dudek-Wicher R., 2021. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, **10(2)**:165.
- Lamret F., Colin M., Mongaret C., Gangloff S.C., & Reffuveille F., 2020. Antibiotic Tolerance of *Staphylococcus aureus* Biofilm in Periprosthetic Joint Infections and Antibiofilm Strategies. *Antibiotics (Basel)*, **9(9)**: 547.
- Lancini G. C., Parenti F., et Gallo G., G., 1995. Antibiotics A Multidisciplinary Approach. Springer Science+Business Media New York. 278p.
- Latorre A.A., Van Kessel J.S., Karns J.S., Zurakowski M.J., Pradhan A.K., Boor K.J., Jayarao B.M., Houser B.A., Daugherty C.S., & Schukken Y.H., 2010. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, **93 (6)**:2792–2802.
- Laverty G., Gorman S.P., & Gilmore B.F., 2013. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. *Future Microbiology*, **8(4)**: 509-24.
- Le Page G., Gunnarsson L., Snape J., & Tyler C.R., 2017. Integrating human and environmental health in antibiotic risk assessment: A critical analysis of protection goals, species sensitivity and antimicrobial resistance. *Environment International*, **109**: 155-169.

- **Lee K.W.K., Periasamy S., Mukherjee M., Xie C., Kjelleberg S., & Rice S.A., 2014.** Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *ISME Journal*, **8(4)**: 894-907.
- **Lerminiaux N.A., & Cameron A.D.S., 2019.** Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, **65(1)**: 34-44.
- **Levy S.B., 2002.** Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **49(1)**:25–30.
- **Li Y., Zhang M., Luo J., Chen J., Wang Q., Lu S., & Ji H., 2020.** Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from retail foods in northern Xinjiang, China. *Food Science & Nutrition*, **8(4)**: 2035–2051.
- **Lin Q., Sun H., Yao K., Cai J., Ren Y., & Chi Y., 2019.** The prevalence, antibiotic resistance and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* in Bulk Ready-To-Eat Foods. *Biomolecules*, **9(10)**: 524.
- **Lira M.C., Givisiez P.E.N., De Sousa F.G.C., Magnani M. De souza E.L., Spricigo D.A., Gebreyes W.A.,& De Oliviera C.J.B., 2016.** Biofilm-forming and antimicrobial resistance traits of *staphylococci* isolated from goat dairy plants, *Journal of Infection in Developing Countries*, **10(9)**: 932-938.
- **Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D. A., & Clark D. P., 2010.** Brock biology of microorganisms (13th Edition). Ed. Benjamin Cummings (PEARSON). 1152p.
- **Mah T.F., 2012.** Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*, **7(9)**: 1061-72.
- **Martinez J.L., 2014.** General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug discovery today Technologies*, **11**: 33-9.
- **Mathur H., Field D., Rea M.C., Cotter P.D., Hill C., & Ross R.P., 2018.** Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *NPJ Biofilms Microbiomes*, **4**: 9.
- **McManus P.S., Stockwell V.O., Sundin G.W., & Jones A.L., 2002.** Antibiotic Use in Plant Agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, **40(1)**: 443-65.
- **Mion S., Rémy B., Plener L., Chabrière É., & Daudé D., 2019.** *Quorum sensing et quorum quenching* : Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence ? *Médecine/ Sciences (Paris)*, **35** : 31–38.
- **Mizan M.F.R., Jahid I.K., & Ha S.D., 2015.** Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge. *Food Microbiology*, **49**:41-55.
- **Mokoena M., 2017.** Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, **22**:1255.
- **Monegro A. F., Muppidi V., & Regunath H., 2017.** Hospital Acquired Infections. Book from Stat Pearls Publishing, Treasure Island (FL), 20 Jul 2017.
- **Moračanin S.V., Djukić D., Zdolec N.,& Milijašević M., 2017.** Antimicrobial resistance of lactic acid bacteria in fermented food. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, **18**: 25-35.
- **Mridha D., Uddin M.N., Alam B., Akhter A.H.M.T., Islam S.K.S., Islam M.S., Khan M.S.R., & Kabir S.M.L., 2020.** Identification and characterization of *Salmonella* spp. from samples of broiler farms in selected districts of Bangladesh. *Veterinary World*, **13**: 275–283.
- **Muhsin J., Wisal A., Saadia A., Fazal J., Muhammad I., & Asif N., M., 2017.** Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, **81 (1)**: 7-11.
- **Munita J.M., & Arias C.A., 2016.** Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, **4(2)**:10.

- **Muthukrishnan G., Masters E.A., Daiss J.L., & Schwarz E.M., 2019.** Mechanisms of Immune Evasion and Bone Tissue Colonization that make *Staphylococcus aureus* the Primary Pathogen in Osteomyelitis. *Current Osteoporosis Reports*, **17(6)**: 395–404.
- **Nadeem S.F., Gohar U.F., Tahir S.F., Mukhtar H., Pornpukdeewattana S., Nukthamna P., Ali A.M.M., Bavisetty S.C.B., & Massa S., 2020.** Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, **46(5)**: 578-599.
- **Newell D.G., Koopmans M., Verhoef L., Duizer E., Aidara-Kane A., Sprong H., Opsteegh M., Langelaar M., Threlfall J., Scheutz F., Giessen J.V.D., & Kruse H., 2010.** Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, **139 (1)**: S3–S15.
- **Paluch E., Rewak-Soroczyńska J., Jędrusik I., Mazurkiewicz E., & Jermakow K., 2020.** Prevention of Biofilm Formation by Quorum Quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **104(5)**: 1871-1881.
- **Pana M., 2012.** Antibiotic resistant bacteria – A continuous challenge in the New Millennium. *Ed .In TechOpen*. Croatia. 576p.
- **Peterson E., & Kaur P., 2018.** Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers In Microbiology*, **9**: 2928.
- **Pettigrew M., Johnson J.K., & Harris A.D., 2016.** The human microbiota: novel targets for hospital-acquired infections and antibiotic resistance. *Annals of Epidemiology*, **26(5)**: 342-7.
- **Piepersberg W., Distler J., Heinzel P. & Perez-Gonzalez J., 1988.** Antibiotic resistance by modification: many resistance genes could be derived from cellular control genes in *actinomycetes*. – A hypothesis. *Actinomycetologica*, **2**: 83–98.
- **Poole K., 2005.** Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **56**: 20–51.
- **Poulsen L.V., 1999.** Microbial Biofilm in Food Processing. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*, **32(6)**: 321-326.
- **Price L.B., Stegger M., Hasman H., Aziz M., Larsen J., Andersen P.S., Pearson T., Waters A.E., Foster J.T., Schupp J., Gillece J., Driebe E., Liu C.M., Springer B., Zdovc I., Battisti A., Franco A., Zmudzki J., Schwarz S., Butaye P., Jouy E., Pomba C., Porrero M.C., Ruimy R., Smith T.C., Robinson D.A., Weese J.S., Arriola C.S., Yu F., Laurent F., Keim P., Skov R., & Aarestrup F.M., 2012.** *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *MBio*, **3(1)** 00305-00311.
- **Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., & Sintim H.O., 2015.** Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, **7(4)**: 493-512.
- **Reading N.C., & Sperandio V., 2006.** Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **254(1)**: 1-11,
- **Ren Y., Wang C., Chen Z., Allan E., Van der Mei H.C., & Busscher H.J., 2018.** Emergent heterogeneous micro-environments in biofilms: substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. *FEMS Microbiology Reviews*, **42**: 259–72.
- **Reygaert W.C., 2018.** An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, **4(3)**: 482–501.

- Roy R., Tiwari M., Donelli G., & TiwariVishvanath., 2018. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, **9(1)**: 522-554.
- Saxena P., Joshi Y., Rawat K., & Bisht R., 2018. Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian Journal of Microbiology*, **59(1)**: 3-12
- Scheie A.A., & Petersen F.C., 2004. THE Biofilm Concept: Consequences for future Prophylaxis of Oral Diseases? *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **15(1)**: 4-12.
- Scoffone V.C., Trespidi G., Chiarelli L.R., Barbieri G., & Buroni S., 2019. Quorum Sensing as Antivirulence Target in Cystic Fibrosis Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, **20(8)**: 1838.
- Sharma D., Misba L., & Khan A., U., 2019. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, **8**: 76.
- Sharma M., & Anand S.K., 2002. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*, **19**: 627–636.
- Shi X., & Zhu X., 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, **20(9)**: 407-413.
- Siddiky N.A., Sarker M.S., Khan M.S.R., Begum R., Kabir M.E., Karim M.R., Rahman M.T., Mahmud A., & Samad M.A., 2021. Virulence and Antimicrobial Resistance Profiles of *Salmonella enteric* Serovars Isolated from Chicken at Wet Markets in Dhaka. *Bangladesh. Microorganisms*, **9(5)**: 952.
- Simões M., Simões L.C., Vieira M. J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, **43(4)**: 573-583.
- Sirot J., Courvalin P., & Soussy C. J., 1996. Definition and Determination of in Vitro Antibiotic Susceptibility Breakpoints for Bacteria. *Clinical Microbiology Infection*, **2(1)**: 5-10.
- Solano C., Echeverez M., & Lasa I., 2014. Biofilm Dispersion and Quorum Sensing. *Current Opinion in Microbiology*, **18**: 96-104.
- Spelman D.S., 2002. Hospital-acquired infections. *Medical Journal of Australia*, **176(6)**: 286-291.
- Stewart P.S., 1994. Biofilm accumulation model that predicts antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **38(5)**: 1052–1058.
- Stockwell V.O., & Duffy B., 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. *OIE Scientific and Technical Review*, **31(1)**: 199-210.
- Struelens M.J., 1998. The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital acquired infections: problems and possible solutions. *BMJ*, **317(7159)**: 652–654.
- Taban B.M., Aytac S.A., Akkoc N., & Akcelik M., 2013. Characterization of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolates determined from ready-to-eat (RTE) salad vegetables. *Brazilian journal of microbiology*, **44(2)**: 385–391.
- Tang K.L., Caffrey N.P., Nóbrega D.B., Cork S.C., Ronksley P.E., Barkema H.W., Polachek A.J., Ganshorn H., Sharma N., Kellner J.D., & Ghali W.A., 2017. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health*, **1(8)**: e316-e327.

- **Thapa P.S., Shrestha S., & Anal K.A., 2020.** Addressing the antibiotic resistance and improving the food safety in food supply chain (farm-to-fork) in Southeast Asia. *Food Control*, **108**: 106809.
- **Tiedje J.M., Fang W., Manaia C.M., Vitra M., Sheng H., Liping M., Zhang T., & Topp E., 2019.** Antibiotic resistance genes in the human impacted environment: a one health perspective. *Pedosphere*, **29(3)**:273–282.
- **Toyofuku M., Inaba T., Kiyokawa T., Obana N., Yawata Y., & Nomura N., 2016.** Environmental Factors That Shape Biofilm Formation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **80(1)**: 7-12.
- **Tremblay Y.D.N., Hathroubi S., & Jacques M., 2014.** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **78(2)**: 110–116.
- **Van Boeckel T., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., Teillant A., & Laxminarayan R., 2015.** Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **(18)**: 5649-5654.
- **Venter H., Henningsen M.L., Begg S.L., 2017.** Antimicrobial resistance in healthcare, agriculture and the environment: the biochemistry behind the headlines. *Essays in Biochemistry*. **3**; **61(1)**: 1-10.
- **Verraes C., Van Boxstael S., Van Meervenne E, Van Coillie E., Butaye P., Catry B., De Schaetzen M.A., Van Huffel X., Imberechts H., Dierick K., Daube G., Saegerman C., De Block J., Dewulf J., & Herman L., 2013.** Antimicrobial Resistance in the Food Chain:A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **10(7)**: 2643-2669.
- **Wagner E.M., Pracser N., Thalgueter S., Fischel K., Rammer N., Pospíšilová L., Alispahic M., Wagner M., & Rychli K., 2020.** Identification of biofilm hotspots in a meat processing environment: Detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, **328**:108668.
- **Wang Y., Wu J., Lv M., Shao Z., Hungwe M., Wang J., Bai X., Xie J., Wang Y., & Geng W., 2021.** Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **9**: 612285.
- **Wang J., Jiao H., Meng J., Qiao M., Du H., He M., Ming K., Liu J., Wang D., & Wu Y., 2019.** Baicalin Inhibits Biofilm Formation and the Quorum-Sensing System by Regulating the MsrA Drug Efflux Pump in *Staphylococcus saprophyticus*. *Frontiers Microbiology*, **10(10)**: 2800.
- **Waters C.M., & Bassler B.L., 2005.** Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **21**: 319-46.
- **Wimpenny J., Manz W., & Szewzyk., 2000.** Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, **24(5)**: 661-71.
- **Xiong Y., Chen J., Sun X., Xu G., Li P., Deng Q., Yu Z., Chen Z., & Zheng J., 2021.** The Antibacterial and Antibiofilm Activity of Telithromycin Against *Enterococcus spp.* Isolated From Patients in China. *Frontiers in Microbiology*. **11**: 616797.
- **Yang L., Liu Y., Wu H., Høiby N., Molin S., & Song Z., J., 2011.** Current understanding of multi species biofilms. *International Journal of Oral Science*, **3**: 74-81.
- **Yin S., Daum R.S., & Boyle-Vavra S., 2006.** VraSR two-component regulatory system and its role in induction of pbp2 and vraSR expression by cell wall antimicrobials in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **50(1)**: 336-43.

- **Zekar F.M., Granier S.A., Marault M., Yaici L., Gassilloud B., Manceau C., Touati A., & Millemann Y., 2017.** From Farms to Markets: Gram-Negative Bacteria Resistant to Third-Generation Cephalosporins in Fruits and Vegetables in a Region of North Africa. *Frontiers In Microbiology*, **8**: 1569.
- **Zhang S., Oh J.H., Alexander L.M., Özçam M., & Van Pijkeren J.P., 2018.** d-Alanyl-d-Alanine Ligase as a Broad-Host-Range Counterselection Marker in Vancomycin-Resistant Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology*, **200(13)**: 00607-17.
- **Zhao X., Zhao F., Wang J., & Zhong N., 2017.** Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Advances*, **7**: 36670–36683.
- **Zishiri O.T., Mkhize N., & Mukaratirwa S., 2016.** Prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from commercial chickens and human clinical isolates from South Africa and Brazil. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **83(1)**: 1067.