

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2020

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle. AZZAOUI Asmae & Mlle. BELHAKEM Selma Khadidja

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Bactéries d'origine alimentaire résistantes aux antibiotiques:
détection, isolement et formation de biofilms.**

Déposé le 08 Septembre 2020

Jury :

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

Avant-propos

Nos premiers remerciements sont adressés à notre encadreur, BENNAMA R., Maître de conférences au département de biologie, à laquelle nous sommes extrêmement reconnaissantes de nous avoir accordé son expérience et son temps afin de superviser, corriger et finaliser ce travail.

Nous remercions respectueusement les membres de jury Pr. Djibaoui R. Professeur au département de biologie et Dr. BELKACEMI L. Maîtres de conférence à l'école supérieure d'agronomie de Mostaganem, pour l'honneur qu'ils nous ont fait d'avoir acceptés d'examiner et juger notre travail.

Nous profitons aussi pour remercier vivement tous nos enseignants, sans exception, pour avoir contribué à notre formation tout le long de notre cursus universitaire.

Que toutes celles et ceux (ingénieurs de laboratoires, amis etc.) qui nous ont aidés de près ou de loin trouvent ici l'expression de nos sincères remerciements.

Notre immense gratitude va à nos chers parents pour leur soutien matériel et moral et surtout de nous avoir supportées lors de la réalisation de ce mémoire.

Ceci est un mémoire de fin d'études qui vise une communauté scientifique bien distincte, à savoir les enseignants de microbiologie alimentaire et médicale ou d'un autre domaine apparenté, tel que la pharmacie et constitue également une ressource future pour les étudiants. Dans ce document, différentes sources sont citées et assez d'informations sont fournies pour mieux cerner le thème choisi et discuter les résultats obtenus lors du travail effectué au laboratoire.

Enfin, nous tenons à préciser que la partie expérimentale n'a pas pu être complétée comme il était prévu suite à la pandémie de covid-19 qui a amené à la fermeture soudaine des laboratoires.

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

1. Chaîne de production alimentaire	3
1.1. Définition	3
1.2. Lait et produits laitiers	5
1.3. Viandes et produits carnés	5
1.4. Fruits et légumes	6
2. Sécurité alimentaire	7
2.1. Définition	7
2.2. Principes et importance de la sécurité alimentaire	7
2.3. Germes bénéfiques et germes pathogènes	9
3. Résistance aux antibiotiques	11
3.1. Définition et utilisations des antibiotiques	11
3.2. Définition et mécanismes de la résistance aux antibiotiques	13
3.3. Problématique environnementale et médicale de la résistance aux antibiotiques	15
4. Biofilms en relation avec les aliments	17
4.1. Définition d'un biofilm	17
4.2. Etapes de formation d'un biofilm	19
4.2.1. Attachement	19
4.2.2. Formation des micro-colonies	20
4.2.3. Maturation	20
4.2.4. Dispersion	20
4.3. Les biofilms et la résistance aux antibiotiques	21

Partie II: Partie Expérimentale

Matériel et méthodes

1. Milieux de culture utilisés	23
1.1. Milieu M17	23
1.2. Milieu Mueller-Hinton	23
1.3. Milieu MRS	23
1.4. Milieu Trypticase Soja	24
2. Echantillons étudiés	24
3. Détection des isolats antibio-résistants	25
3.1. Préparation des échantillons et établissement de l'antibiogramme	25
3.2. Lecture et sélection des isolats antibio-résistants	26

3.3. Purification et pré-identification des isolats	26
3.3.1. Étude morphologique	27
3.3.1.1. Examen macroscopique	27
3.3.1.2. Examen microscopique	27
a) Observation à l'état frais	27
b) Observation après coloration de Gram	28
4. Confirmation de l'antibio-résistance des isolats	28

Résultats et discussion

1. Détection des isolats antibio-résistants	29
1.1. Détection à partir des échantillons de beurre	30
1.2. Détection à partir des échantillons de fromages	33
2. Pré-identification des isolats retenus	35
3. Confirmation de l'antibiorésistance de certains isolats	37

Partie III: Présentation d'articles scientifiques

Article 1: The Prevalence, Antibiotic Resistance and Biofilm Formation of Staphylococcus aureus in Bulk Ready-To-Eat Foods (Lin <i>et al.</i> , 2019)	40
Article 2: Antibiotic Susceptibility of Different Lactic Acid Bacteria Strains (Karapetkov <i>et al.</i> , 2011)	52

Conclusion	62
Références bibliographiques	64
Annexes	

Résumé

Lors du présent travail, un protocole rapide a été mis en place afin de détecter et d'isoler des bactéries résistantes aux antibiotiques contenues dans certains produits laitiers. Cette résistance a été testée vis-à-vis de 7 antibiotiques: acide fusidique, chloramphénicol, érythromycine, oxacilline, pénicilline G, spiramycine et vancomycine, sur les milieux TSA et MRS-agar, par la méthode de diffusion sur gélose. Les résultats observés varient à la fois selon le milieu utilisé et la nature du produit analysé. Par exemple, les bactéries du beurre industriel ont présenté une sensibilité à la majorité des antibiotiques testés sur les deux milieux utilisés. Tous les isolats présélectionnés antibio-résistants ont été pré-identifiés par la détermination de leurs aspects morphologiques (macroscopiques et microscopiques). Enfin, pour certains isolats retenus un antibiogramme servant de confirmation et de vérification de l'efficacité du protocole suivi a été réalisé. Les isolats I3 (beurre traditionnel), I7 (beurre traditionnel) et I8 (beurre industriel) détectés résistants respectivement à la spiramycine, l'acide fusidique et la vancomycine ont montré après confirmation une multi-résistance aux antibiotiques testés.

Par ailleurs, les articles scientifiques de Lin *et al.* (2019) et Karapetkov *et al.* (2011) plutôt traduits et présentés qu'analysés ont reporté et confirmé la présence de bactéries antibio-résistantes dans plusieurs types de produits alimentaires entre autres, les aliments prêts à consommer, les produits laitiers et les fruits.

Mots-clés : bactéries antibio-résistantes, présence, aliments, produits laitiers, antibiotiques, détection, isolement, formation de biofilms.

Abstract

During this work, a rapid protocol was established in order to detect and isolate bacteria with antibiotics resistance contained in some dairy products. This resistance was tested against 7 antibiotics: fusidic acid, chloramphenicol, erythromycin, oxacillin, penicillin G, spiramycin and vancomycin, on TSA and MRS agar, using agar diffusion method. The observed results vary both according to the medium used and the nature of the product analysed. For example, the isolates from industrial butter showed susceptibility to the majority of the antibiotics tested on the two media used. All the preselected antibiotic-resistant isolates were pre-identified by the determination of their morphological aspects (macroscopic and microscopic). Finally, for some selected isolates, an antibiogram was performed to confirm and verify the effectiveness of the protocol followed. The isolates I3 (traditional butter), I7 (traditional butter) and I8 (industrial butter) detected respectively resistant to spiramycin, fusidic acid and vancomycin, showed after confirmation a multi-resistance to the tested antibiotics.

Furthermore, the scientific papers of Lin *et al.* (2019) and Karapetkov *et al.* (2011), translated and presented rather than analysed, reported and confirmed the occurrence of antibiotic-resistant bacteria in several types of food products, including ready-to-eat foods, dairy products and fruits.

Key words: antibiotic-resistant bacteria, occurrence, foods, dairy products, antibiotics, detection, isolation, biofilm formation.

ABC : ATP Binding Cassette
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AHL : Acyl Homoserine Lactones
AI : Auto-Inducteurs
AIP : AutoInducing Peptides
ALOP : Appropriate Level Of Protection
AST : Antibiotic Susceptibility Testing
ATP : Adénosine TriPhosphate
C : Chloramphenicol
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB : Concentration Minimale Bactéricide
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
DO : Densité Optique
E : Erythromycin
EFSA : European Food Safety Authority
EPS : Extracellular Polymeric Substances
FAO : Food and Agriculture Organization
FC : Fucidic Acid
FDA : Food and Drug Administration
FIL : Fédération Internationale de Laiterie
FSO : Food Safety Objectives
GAP : Good Agricultural Practices
GG : Gorbach and Goldin
GHP : Good Hygienic Practices
GMP : Good Manufacturing Practices
GRAS : Generally Regarded As Safe
H : Hydrogène
HACCP : Hazard Analysis and Critical Control Points
ICMSF : International Commission on Microbiological Specifications for Foods
IDF : International Dairy Federation
ISO : International Organization for Standardization
LM17 : milieu M17 additionné de Lactose

MATE : Multi-Antimicrobial Extrusion Protein

MFS : Major Facilitator Superfamily

MRS : de Man, Rogosa and Sharpe

Na : Sodium

O₂ : Dioxygène

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OX : Oxacillin

P : Penicillin

pH : Potentiel Hydrogène

PO : Performance Objectives

pO₂ : pression du dioxygène

P/V : poids/volume

QQ : Quorum Quenching

QPS : Qualified Presumption of Safety

QS : Quorum Sensing

RASRBA : Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques

RND : Resistance-Nodulation-cell Division

S : Smooth

SMR : Small Multidrug Resistance

SP : Spiramycin

T : Température

TSA : Tryptic Soy Agar

TSB : Tryptic Soy Broth

UFC : Unité Formant Colonie

USDA : United States Department of Agriculture

VA : Vancomycin

WHO : World Health Organization

Tableau I : Exemples de principales bactéries impliquées dans les maladies d'origine alimentaire: intoxications et toxi-infections alimentaires.	10
Tableau II : Exemples d'antibiotiques approuvés aux États-Unis pour utilisation chez les animaux destinés à l'alimentation.	12
Tableau III : Modes d'action et mécanismes de résistance aux antibiotiques couramment utilisés.	14
Tableau IV : Types de produits laitiers utilisés dans la présente étude.	24
Tableau V : Disques d'antibiotiques (Liofilchem®) utilisés dans la présente étude.	26
Tableau VI : Diamètres des zones d'inhibition pour les échantillons de fromages.	35
Tableau VII : Résultats de la pré-identification des premiers isolats détectés antibiotico-résistants.	36

Figure 1 : La production alimentaire et la chaîne d'approvisionnement.	4
Figure 2 : Arbre de décision adapté du <i>Codex Alimentarius</i> .	8
Figure 3 : Temple de la sécurité alimentaire.	9
Figure 4 : Mécanismes majeurs de la résistance bactérienne aux antibiotiques.	15
Figure 5 : Utilisation des antibiotiques et différentes voies de transmission de la résistance aux antibiotiques dans la chaîne de production alimentaire.	16
Figure 6 : Systèmes « <i>quorum sensing</i> » chez les bactéries.	18
Figure 7 : Etapes de formation d'un biofilm et facteurs influençant.	19
Figure 8 : Un échantillon de camembert avant le traitement.	25
Figure 9 : Aspects de l'antibiogramme de l'échantillon de beurre traditionnel réalisé sur milieu TSA pour les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} , après 18 h d'incubation à 37°C.	31
Figure 10 : Aspects de l'antibiogramme de l'échantillon de beurre traditionnel réalisé sur milieu MRS à partir des dilutions mère et 10^{-1} , après 18 h d'incubation à 37°C.	32
Figure 11 : Aspects de l'antibiogramme de l'échantillon de fromage frais réalisé sur milieu MRS à partir des dilutions mère et 10^{-1} , après 18 h d'incubation à 37°C.	34
Figure 12 : Aspects de l'antibiogramme de l'échantillon de fromage frais réalisé sur milieu TSA à partir des dilutions mère et 10^{-1} , après 18 h d'incubation à 37°C.	34
Figure 13 : Antibiogramme de confirmation du profil multi-résistant de l'isolat İ3.	37
Figure 14 : Antibiogramme de confirmation du profil multi-résistant des isolats İ7 et İ8.	38

Introduction

Introduction

La chaîne de production des aliments constitue un écosystème où de nombreuses bactéries coexistent, souvent sous une pression exercée par des antibiotiques. Les antibiotiques sont utilisés dans divers contextes pour la production alimentaire. Les animaux sont traités avec des antibiotiques à la fois pour guérir les maladies et favoriser la croissance, les arbres fruitiers sont souvent traités de manière prophylactique avec des antibiotiques pour contrôler les infections bactériennes et l'aquaculture repose sur des antibiotiques pour gérer les maladies infectieuses. Dans chacune de ces situations, les effets des antibiotiques s'étendent au-delà du site d'utilisation. Les antibiotiques appliqués dans les opérations d'élevage d'animaux sont lessivés dans les cours d'eau et les eaux souterraines. Dans de nombreux milieux aquacoles, les antibiotiques se diffusent dans l'eau entourant les enclos, et les antibiotiques pulvérisés sur les plantes peuvent dériver dans les airs (**Allen *et al.*, 2010; Florez-Cuadraro *et al.*, 2018**).

L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques est devenue un problème majeur pour la sécurité alimentaire et la santé publique. Son transfert potentiel à partir d'organismes commensaux bénéfiques comme les bactéries lactiques vers des bactéries pathogènes peut accentuer ce problème (**McEwen et Fedorka-Cray, 2002; Toomey *et al.*, 2009**). Cette résistance se définit par leur capacité à résister à l'activité inhibitrice ou destructrice des antibiotiques employés selon plusieurs mécanismes: dégradation enzymatique, modification de la cible et modification de la perméabilité de la paroi cellulaire etc. (**Verraes *et al.*, 2013**).

Une autre stratégie importante liée à la résistance aux antibiotiques est la formation d'un biofilm, communauté de bactéries attachées à une surface et intégrées dans une matrice extracellulaire. Ce consortium microscopique pouvant être composé d'une ou plusieurs espèces est un site favorable privilégié pour la diffusion horizontale des gènes de résistance aux antibiotiques. La conjugaison entre les cellules au sein d'un biofilm a été signalée comme étant 700 fois plus efficace que les cellules bactériennes libres (planctoniques) (**Bowler, 2018; Yan et Bassler, 2019**).

Par conséquent, étant donné son énorme impact, nous avons axé notre mémoire de fin d'étude sur le thème suivant : « Bactéries d'origine alimentaire résistantes aux antibiotiques: détection, isolement et formation de biofilms».

Ce travail a visé donc la détection puis l'identification par des méthodes microbiologiques classiques des bactéries antibio-résistantes récupérées à partir d'aliments judicieusement choisis, et qui sont consommés quotidiennement par la majorité des individus (produits laitiers). Des essais de formation de biofilms comme forme de résistance ont aussi été prévus.

Ce mémoire est organisé en trois parties :

- **La partie bibliographique** : elle donne un aperçu général de la chaîne de production alimentaire, la sécurité alimentaire, la résistance aux antibiotiques et la formation de biofilms en relation avec les aliments.
- **La partie expérimentale** : elle comporte le protocole suivi (matériel et méthodes), les résultats ainsi que leur discussion.
- **La partie présentation d'articles** : elle concerne la présentation de publications scientifiques en rapport avec le thème choisi, afin d'offrir des informations supplémentaires sur le sujet et valoriser le travail réalisé au laboratoire.

Enfin, nous rappelons que la partie expérimentale n'a pas pu être complétée comme il a été prévu à cause de la pandémie de covid-19 qui a incité à la fermeture des laboratoires; d'où l'ajout de la partie « présentation d'articles » comme support à notre travail.

Revue Bibliographique

1. Chaîne de production alimentaire

1.1. Définition

La série d'opérations de transformation qui va de la matière première (végétale ou animale) jusqu'à nos assiettes est connue sous le nom de chaîne de production alimentaire, avec la stratégie de la ferme à la fourchette (**Robinson, 2011**). Il s'agit d'un réseau complexe d'entités interconnectées qui va de la production primaire (agricole), passant par la distribution (des denrées animales ou végétales), à la transformation et fabrication, puis l'emballage, et la vente au détail jusqu'au service alimentaire et préparation à domicile par les consommateurs (**Figure 1**). Le mouvement est facilité par une multitude de sociétés de logistique et de transport permettant la mise en valeur des produits pour les consommateurs (**Gorris, 2005**). .

D'un point de vue microbiologique, les microorganismes peuvent entrer dans la chaîne de production alimentaire à différentes étapes, ils sont très polyvalents et peuvent s'adapter à l'environnement, ce qui permet la survie, la croissance et la production de composés toxiques (**Havelaar et al., 2010**). Des stratégies de gestion des risques sont nécessaires tout au long de la chaîne alimentaire pour réduire l'incidence des maladies causées par des pathogènes d'origine alimentaire (listériose, salmonelloses etc.) et autres problèmes liés à la résistance aux antibiotiques (**Walls et Buchanan, 2005; Fung et al., 2019**).

La Commission Internationale pour la Définition des Caractéristiques Microbiologiques des Aliments (**ICMSF, 2002**) a proposé l'établissement du concept Objectifs de Sécurité Sanitaire des aliments (FSO: Food safety objectives) qui représente "la fréquence et/ou la concentration maximale d'un danger dans un aliment au moment de la consommation et permettant ou contribuant à atteindre un niveau approprié de protection (ALOP)". Le FSO fixe un objectif à atteindre en fin de la chaîne alimentaire sans spécifier comment l'atteindre. Pour certains cas de dangers alimentaires, le FSO sera probablement très bas et formulé comme "absent dans une portion de l'aliment au moment de la consommation". De ce fait, il est demeure important de fixer un niveau qui ne doit pas être dépassé à une étape précédente, dans la chaîne alimentaire. Ce niveau se nomme un Objectif de Performance (PO) et peut être dérivé d'un FSO en soustrayant la contamination attendue et/ou la croissance entre deux points de la chaîne alimentaire. Les FSO et les PO ont été introduits pour mieux sensibiliser les professionnels dans les différents secteurs de la chaîne alimentaire et constituent des outils supplémentaires à des programmes tels que l'Analyse

des Dangers et Points Critiques pour leur Maîtrise (HACCP) et aux Bonnes Pratiques Agricoles (GAPs), de Fabrication (GMP) et d'Hygiène (GHP) qui permettent de les atteindre (ICMSF, 2006).

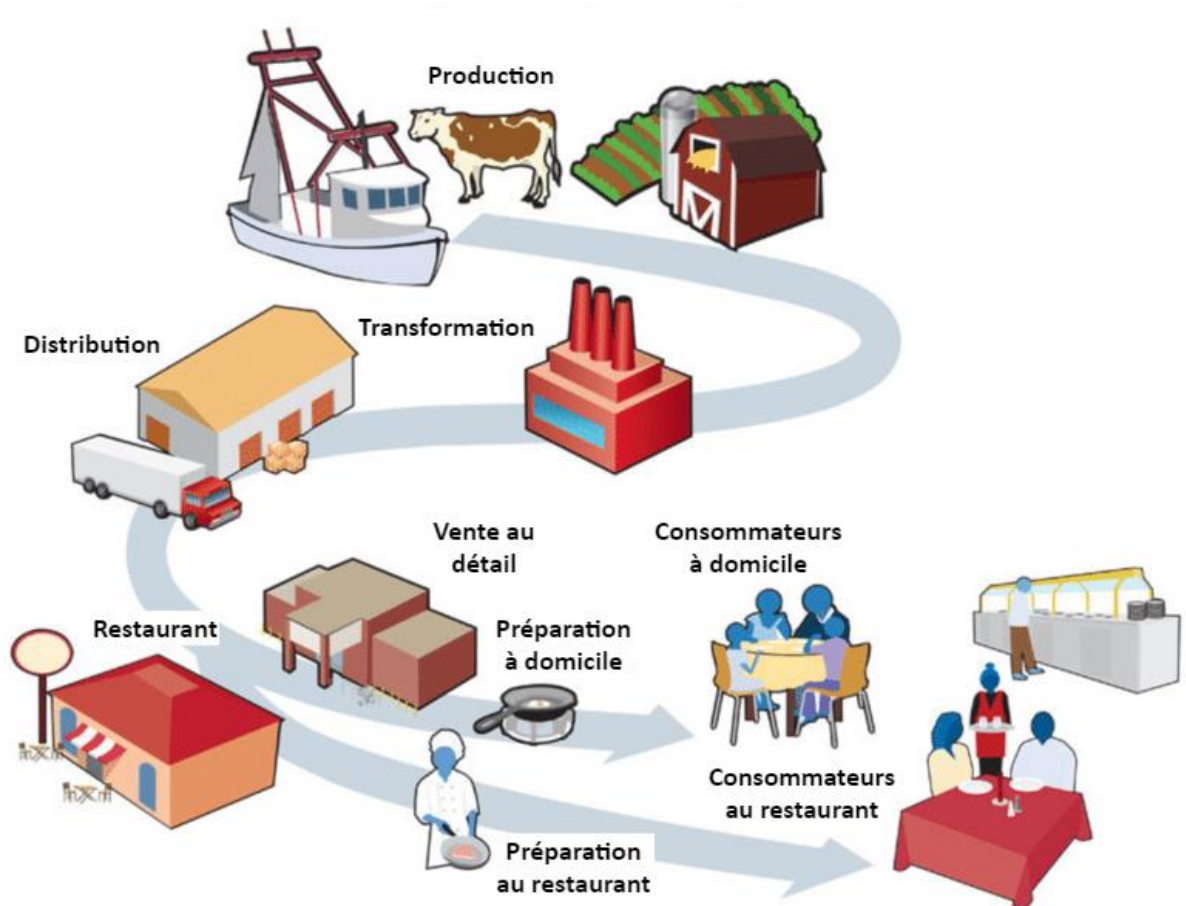


Figure 1 : La production alimentaire et la chaîne d'approvisionnement (Gabriel, 2016).

1.2. Lait et produits laitiers

Le lait est la sécrétion de la glande mammaire chez plus de 4000 espèces de mammifères femelles et constitue l'alimentation de leur progéniture aux premiers stades de leur vie (**Hambraeus et Lönnerdal, 2003**). Il peut être produit par des bufflonnes, chèvres et chamelles, mais le plus consommé par l'homme reste le lait de vache. Le lait contient des protéines, du lactose, de la matière grasse et des minéraux qui le rendent très périssable dans son état naturel. Il est surtout converti et/ou fermenté en produits tels que les fromages, yaourts, beurres etc. (**Singh et Bennett, 2002**).

La gestion de la santé animale est extrêmement importante pour la production d'un lait salubre exclut de toute contamination interne via les mammites ou externe par la matière fécale, via les infections gastro-intestinales (**Oliver et al., 2005**). Pour ces raisons, des programmes de lutte sont élaborés et mis en œuvre dans de nombreux pays. Ces programmes sont généralement axés sur cinq principes de base : la désinfection des trayons avant et après la traite, l'administration d'antibiotiques, le traitement approprié des cas cliniques, l'abattage des vaches infectées de façon chronique et l'entretien régulier de la machine à traire (**Vissers et Driehuis, 2009**). Aussi, les animaux laitiers et leur environnement sont des réservoirs de bactéries commensales et pathogènes qui peuvent transporter des déterminants de la résistance aux antibiotiques et contribuer à son évolution lorsqu'elles accèdent à la chaîne alimentaire humaine (**O'Mahony et al., 2009**).

1.3. Viandes et produits carnés

La viande rouge est naturellement riche en nutriments tels que les minéraux, les vitamines et les acides gras essentiels et constitue une excellente source de protéines. Le régime alimentaire ou les systèmes d'alimentation des animaux peuvent influencer cette composition nutritionnelle ainsi que sa qualité organoleptique (texture, goût etc.) (**Lawrie, 1983; Ponnampalam et al., 2019**). Des promoteurs de croissance sont utilisés pour augmenter la quantité de muscle qu'un animal peut produire. Les trois mécanismes de base sont les antibiotiques, les hormones et les β -agonistes. Considérées comme une stratégie de développement durable de l'élevage, ces technologies réduiraient la quantité d'aliments nécessaires à l'animal. Cependant, le principal problème réside dans la résistance aux antibiotiques, car leur utilisation risque d'entraîner l'échec d'un traitement dans le cas d'infections humaines (**Grandin, 2019**).

1.4. Fruits et légumes

Les fruits et légumes jouent un rôle important dans la nutrition et la santé humaines, en particulier en tant que sources de vitamine C, de thiamine, de niacine, de pyridoxine, d'acide folique, de minéraux et de fibres alimentaires. De plus, de nombreuses organisations (OMS, FAO, USDA, EFSA) recommandent une augmentation de la consommation de fruits et légumes pour aider à réduire le risque des maladies cardiovasculaires et de cancer (**Oliveira et al., 2015**). Cependant, les fruits et légumes sont hautement périssables et certains ont une durée de conservation de quelques jours seulement (**Estrada-Flores, 2010**) et les problèmes de sécurité alimentaire liés à leur consommation deviennent évidemment une préoccupation publique (**Hu et al., 2017**).

De même, il a été rapporté que des épidémies d'origine alimentaire dans le monde sont de plus en plus liées à la consommation de fruits et légumes frais et de jus non pasteurisés. Ces incidents ont poussé tous les acteurs de la chaîne alimentaire: producteurs, expéditeurs, transformateurs, distributeurs, détaillants, importateurs et même les responsables des gouvernements et de la santé publique à réévaluer le risque, d'en contracter et réévaluer les pratiques actuelles de production et de manutention. Bien que la probabilité de contracter une maladie d'origine alimentaire par la consommation de fruits ou légumes frais soit très faible, une faible probabilité existe. Comme ils sont souvent consommés crus sans étape de «destruction» des agents pathogènes, la prévention demeure le seul moyen pratique et efficace pour garantir que ces produits alimentaires sont sains et sûrs pour la consommation (**Gorny, 2006; Markland et al., 2017**).

Les procédures impliquées dans leur production sont la préparation des champs, la germination des semences, le forage et la plantation, la croissance, l'application d'engrais et/ou pesticides, l'irrigation, la récolte, la transformation, le stockage, la manutention et la distribution. Chaque étape peut être une source de dangers incluant des agents biologiques tels que les bactéries, les virus, les parasites protozoaires, les champignons et les plantes toxiques. De même que des produits chimiques toxiques et des antibiotiques utilisés en agriculture et autres dangers physiques tels que les pierres, le verre, les insectes et les rongeurs (**McClure, 2011; Jung et al., 2014; Hu et al., 2017**).

2. Sécurité alimentaire

2.1. Définition

La sécurité, la disponibilité et la valeur nutritionnelle des aliments figurent parmi les besoins fondamentaux de la vie humaine. La sécurité de la chaîne de production alimentaire est une question très complexe impliquant un large éventail de parties prenantes et d'experts **(Brunet *et al.*, 2008; Lehotay, 2018)**. Selon la FAO, la sécurité alimentaire existe lorsque toutes les personnes à tout moment ont un accès physique et économique à une nourriture suffisante, sûre et nutritive, afin de répondre à leurs besoins et préférences alimentaires pour un mode de vie actif et sain **(Alpas, 2008)**.

2.2. Principes et importance de la sécurité alimentaire

La sécurité alimentaire est une discipline scientifique décrivant la manipulation, la préparation et le stockage des aliments de manière à prévenir les maladies d'origine alimentaire. Il a été démontré qu'une nourriture de mauvaise qualité peut entraîner un vieillissement prématuré et des maladies neurologiques telles que l'épilepsie, la schizophrénie, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, etc. **(Virmani *et al.*, 2013)**. Les aliments peuvent transmettre des maladies d'une personne à l'autre et servir de milieu de croissance aux bactéries qui peuvent provoquer une intoxication alimentaire. Les débats sur la sécurité des aliments transgéniques portent sur des questions telles que l'impact des aliments génétiquement modifiés sur la santé des générations futures et la pollution génétique de l'environnement, qui peut détruire la diversité biologique naturelle **(Ermakova, 2008)**. Les systèmes de gestion de la sécurité alimentaire tels que le système HACCP peuvent aider à prévenir la contamination délibérée des aliments. Considérés comme attractifs et rentables, ces systèmes sont déjà largement utilisés par l'industrie alimentaire pour éviter les contaminations accidentelles ou intentionnelles **(Smith, 2008)**.

La méthode HACCP « *Hazard Analysis and Critical Control Point* » est une démarche qui identifie, évalue et maîtrise les dangers significatifs au regard de la sécurité des aliments. Développée dans les années soixante par le programme *Codex Alimentarius*, en établissant un arbre de décision **(Figure 2)**, afin de voir la nécessité d'un point de contrôle critique (PCC) dans la maîtrise d'un danger particulier à une étape donnée **(Samna Soumana *et al.*, 2020)**. La méthode HACCP a été introduite en 1993 dans la Directive Européenne 93/43/CEE relative à l'hygiène des denrées alimentaires et est également intégrée à la norme ISO 22000

- Système de management de la sécurité des produits alimentaires à tous les niveaux de la chaîne de production alimentaire depuis 2005 (Bleichner et Legrand-Hamon, 2019).

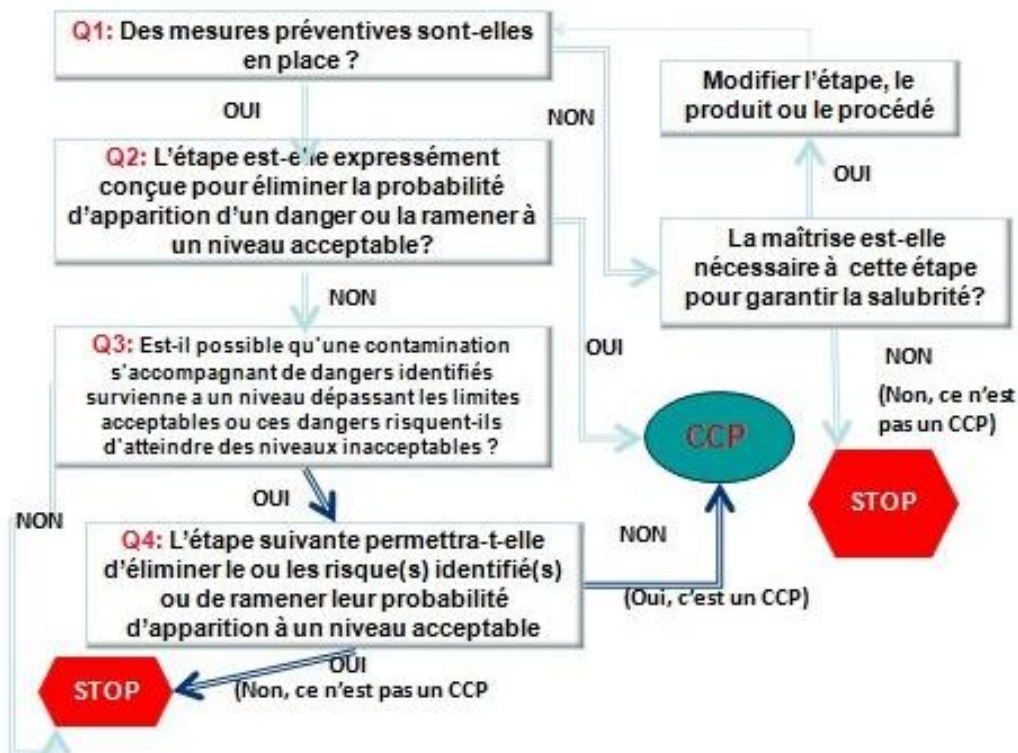


Figure 2 : Arbre de décision adapté du *Codex Alimentarius* (Samna Soumana *et al.*, 2020).

Lorsque le HACCP est efficacement conçu sur des connaissances scientifiques solides, mis en œuvre et maintenu par un personnel qualifié, plusieurs bénéfices s'installent: d'abord, la protection de la santé publique qui doit être la priorité numéro un pour quiconque dans l'industrie alimentaire, ensuite l'économie d'argent grâce à la prévention des échecs. C'est le programme le plus large et robuste qui entre essentiellement dans la protection de la marque ou la gamme de produits d'une entreprise. Enfin, l'identification des points de contrôle qui nécessitent une surveillance en temps réel tout au long du processus de production, des mesures correctives peuvent être prises avant la fabrication des produits finis, évitant ainsi le gaspillage et permettant à une entreprise de respecter les obligations réglementaires et les attentes des clients en matière de sécurité alimentaire. Cependant,

chaque individu et organisation a un rôle que L'OMS a défini comme le concept de « responsabilité partagée » (Figure 3) (Wallace *et al.*, 2018).

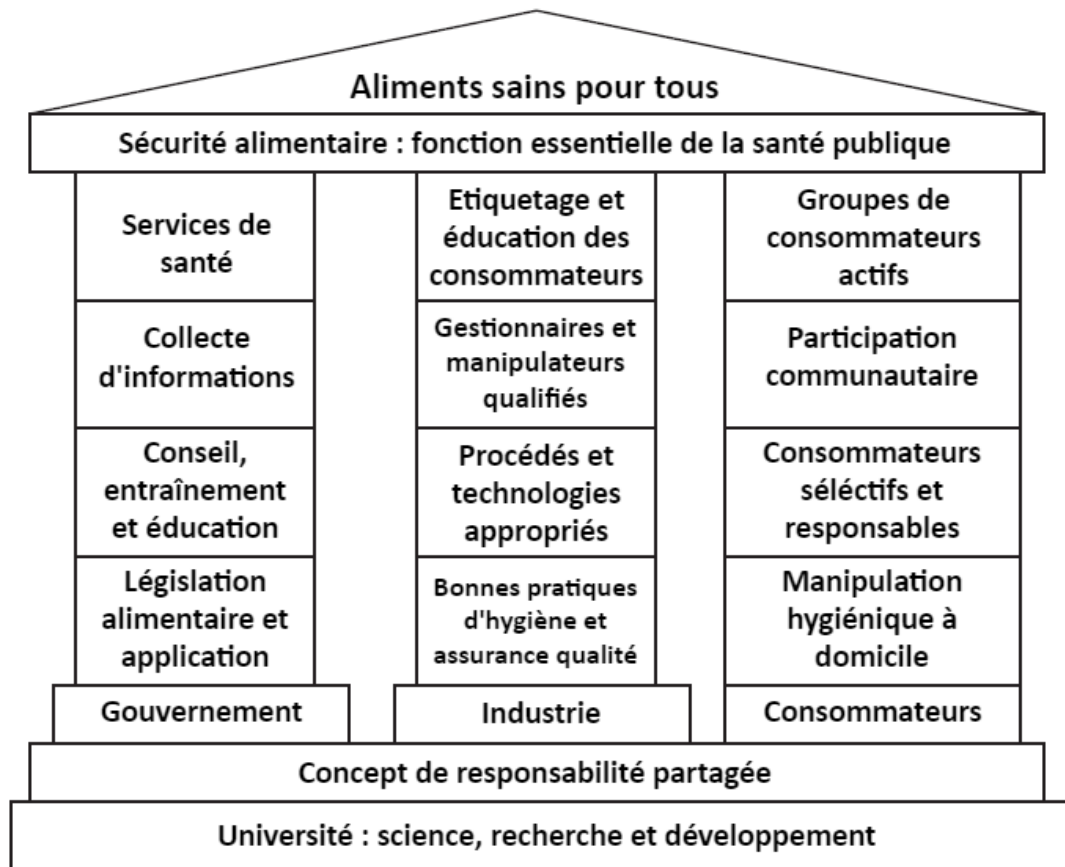


Figure 3 : Temple de la sécurité alimentaire (Wallace *et al.*, 2018).

2.3. Germes bénéfiques et germes pathogènes

Les aliments sont des écosystèmes d'une composition variée influencés par l'environnement et les organismes qui y vivent : les germes bénéfiques ou utiles sont ceux qui sont utilisés dans la production d'aliments (yaourt, vin, bière etc.), les germes d'altération causent leur détérioration et les germes pathogènes provoquent des affections appelées maladies d'origine alimentaire (Tableau I) (Montville *et al.*, 2012).

Tableau I. Exemples de principales bactéries impliquées dans les maladies d'origine alimentaire: intoxications et toxi-infections alimentaires (**Gibson et al., 2005**).

Espèces bactériennes	Aliments pouvant être contaminés
<i>Bacillus cereus</i>	Riz cuit, viande
<i>Campylobacter</i> spp.	Volaille, lait non pasteurisé
<i>Clostridium botulinum</i>	Poisson, viande
<i>Clostridium perfringens</i>	Viande cuite, volaille
<i>Escherichia coli</i>	Viande, lait cru
<i>Listeria monocytogenes</i>	Pâté, fromages à pâte molle
<i>Salmonella</i>	Viande, volaille, œufs
<i>Shigella</i> spp.	Œufs, salades
<i>Staphylococcus aureus</i>	Jambon, volaille, produits laitiers
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Lait, volaille

Dans la catégorie des germes bénéfiques figurent “Les probiotiques” définis comme étant des microorganismes viables non pathogènes, ingérés en quantités suffisantes atteignent l'intestin à l'état actif et exercent ainsi des effets positifs sur la santé (**De Vrese et Schrezenmeir, 2008**). De nombreux aliments fermentés contiennent des probiotiques qui peuvent améliorer la santé gastro-intestinale, réduire le risque de diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires (**Mozaffarian et Wu, 2018**). La plupart des probiotiques sont des bactéries lactiques comme celles du yaourt (ex. *Streptococcus thermophilus*) ou encore des souches de *Lactobacillus* (ex. *Lactobacillus rhamnosus* GG) et des bifidobactéries (**De Vrese et Schrezenmeir, 2008**). Leur nombre dans les aliments tels que les produits laitiers qui contiennent généralement des taux élevés, peut varier considérablement, selon la façon dont ils ont été fabriqués et transformés, ainsi que les conditions et la durée de stockage. Les aliments fermentés peuvent également contenir des vitamines et d'autres molécules bioactives produites *in situ* à partir du métabolisme microbien et qui ne sont pas présentes dans l'aliment d'origine (**Rezac et al., 2018 ; Savaiano et Hutkins, 2020**).

En revanche, les germes pathogènes liés à l'environnement alimentaire en particulier aux produits d'origine animale, avec la volaille et les œufs en tête de liste sont à l'origine de la majorité des cas de maladies d'origine alimentaire (Toxi-infections et intoxications alimentaires). Ces maladies surviennent suite à la consommation d'aliments contaminés par des microorganismes ou de leurs toxines (**Luber, 2009; AL-Mamun, 2018**).

La contamination peut résulter des méthodes de conservation inadéquates, des pratiques de manipulation non hygiéniques, des surfaces en contact avec les aliments ou des personnes hébergeant des microorganismes dans leurs narines et sur la peau. Des pratiques non hygiéniques pendant la préparation, la manipulation et le stockage des aliments créent les conditions permettant la prolifération et la transmission d'organismes pathogènes tels que les bactéries, les virus et d'autres agents pathogènes d'origine alimentaire. La contamination délibérée ou accidentelle des aliments lors d'une production à grande échelle pourrait mettre en danger la santé des consommateurs et avoir des répercussions très coûteuses sur un pays (**Akabanda et al., 2017**).

3. Résistance aux antibiotiques

3.1. Définition et utilisations des antibiotiques

Les antibiotiques sont synthétisés en général par un nombre limité de microorganismes comme métabolites secondaires spécifiques, lorsque le taux de croissance baisse en dessous d'un certain seuil afin de faire face à certaines contraintes, leur rôle majeur dans la nature étant d'éliminer d'autres microorganismes (**Martin et Demain, 1980**). Les antibiotiques sont les principaux outils de traitement des maladies infectieuses bactériennes. Dans les années quarante, l'introduction des antibiotiques a révolutionné la médecine : elle a sauvé la vie de millions de personnes atteintes de pneumonie, septicémie, méningite, infections graves des plaies et infections des voies urinaires. En outre, de nombreuses pratiques médicales modernes y compris la transplantation d'organes, la chimiothérapie pour le cancer et la chirurgie orthopédique seraient des procédures à haut risque sans la disponibilité d'antibiotiques (**WHO, 2011**).

Dans la production d'animaux destinés à l'alimentation, des animaux individuels peuvent être traités, mais il est souvent plus efficace de traiter des groupes entiers par addition d'antibiotiques aux aliments ou à l'eau de boisson. Pour certains animaux, comme la volaille et le poisson, le traitement de masse est le seul moyen possible. Certaines procédures de

masse, appelées métaphylaxie visent à traiter les animaux malades, tout en soignant les autres présents dans le groupe afin de prévenir la maladie. Les producteurs peuvent également administrer des antibiotiques aux animaux (à l'exception des poissons d'élevage), pour favoriser la croissance et améliorer l'efficacité de leur alimentation (**Tableau II**) (**McEwen et Fedorka-Cray, 2002 ; Meek et al., 2015**).

Tableau II. Exemples d'antibiotiques approuvés aux États-Unis pour utilisation chez les animaux destinés à l'alimentation (**McEwen et Fedorka-Cray, 2002**).

Usage	Bovins	Porcs	Volailles	Poissons
Traitement d'infections diverses	Amoxicilline Céfapirine Erythromycine Fluroquinolone Gentamicine Novobiocine Pénicilline Sulfonamides Tilmicosine Tylosine	Amoxicilline Ampicilline Chlortétracycline Gentamicine Lincomycine Sulfaméthazine Tiamuline Tylosine	Erythromycine Fluoroquinolone Gentamicine Néomycine Pénicilline Spectinomycine Tétracyclines Tylosine Virginiamycine	Ormétoprime Sulfonamide Oxytétracycline
Croissance et efficacité de l'alimentation	Bacitracine Chlortétracycline Lasalocide Monensine Oxytétracycline	Acide arsannique Bacitracine Bambermycine Chlortétracycline Erythromycine Pénicilline Tiamuline Tylosine Virginiamycine	Bambermycine Bacitracine Chlortétracycline Pénicilline Tylosine Virginiamycine	

3.2. Définition et mécanismes de la résistance aux antibiotiques

Les définitions publiées concernant la résistance aux antibiotiques varient considérablement, elle peut être décrite en termes de caractéristiques phénotypiques et/ou génotypiques des bactéries, classée en fonction de l'origine (intrinsèque ou acquise) ou du type (unique, multiple ou résistance croisée). Elle est plus simplement une propriété des bactéries qui leur confère la capacité d'inactiver ou bloquer les effets inhibiteurs ou destructeurs des antibiotiques (**Davison et al., 2000**).

Afin de mieux comprendre l'évolution de la résistance, le maintien des gènes de résistance au sein des populations microbiennes et la propagation de ces gènes entre les espèces et les genres, le concept de «résistome» a été introduit. Le résistome comprend la totalité des éléments génétiques dont la fonction est de contrer les effets toxiques des antibiotiques ainsi que la collection de gènes, appelés gènes de protorésistance, qui ont le potentiel d'évoluer en éléments de résistance. Les gènes de résistance peuvent être apportés par une mutation spontanée aléatoire ou acquis à partir d'autres bactéries (**Allen et al., 2010 ; Gallo et Puglia, 2014**). Le transfert horizontal de ces gènes peut se faire à l'aide des bactériophages (transduction) ou des plasmides (conjugaison) dans le cas des espèces bactériennes étroitement apparentées et par l'assimilation directe des gènes de résistance des bactéries lysées dans l'environnement (transformation) (**Sarkar et al., 2018**). Déchiffrer les différentes chaînes de transfert de gènes conduisant à l'acquisition d'un phénotype de résistance aux antibiotiques chez des bactéries pathogènes auparavant sensibles est un défi majeur pour l'écologie microbienne (**Nesme et Simonet, 2015**).

Malgré la grande complexité chimique des antibiotiques, il existe cinq principaux modes d'action : interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire, inhibition de la synthèse des protéines, interférence avec la synthèse des acides nucléiques, inhibition de différentes voies de biosynthèse et formation de pores membranaires (**Tableau III**). Les bactéries peuvent manifester leur résistance par une gamme restreinte de mécanismes moléculaires, le plus souvent par une inactivation enzymatique ou par exportation grâce aux pompes d'efflux (**Figure 4, Tableau III**) (**Tenover, 2006; Yelin et Kishony, 2018**).

Tableau III : Modes d'action et mécanismes de résistance aux antibiotiques couramment utilisés (Davies et Davies, 2010).

Classe d'antibiotiques	Exemple(s)	Cible	Mode(s) de résistance
β-lactames	Pénicillines (ampicilline), céphalosporines (céphamycine), pénèmes (méropénème), monobactames (aztréonam)	Biosynthèse du peptidoglycane	Hydrolyse, efflux, altération
Aminoglycosides	Gentamicine, streptomycine, spectinomycine	Traduction	Phosphorylation, acétylation, nucléotidylation, efflux, altération
Glycopeptides	Vancomycine, teicoplanine	Biosynthèse du peptidoglycane	Reprogrammation de la biosynthèse du peptidoglycane
Tétracyclines	Minocycline, tigécycline	Traduction	Mono-oxygénation, efflux, altération
Macrolides	Erythromycine, azithromycine	Traduction	Hydrolyse, glycosylation, phosphorylation, efflux, altération
Lincosamides	Clindamycine	Traduction	Nucléotidylation, efflux, altération
Streptogramines	« Synercid »	Traduction	C-O lyase (type B), acétylation (type A), efflux, altération
Oxazolidinones	Linézolide	Traduction	Efflux, altération
Phénicol	Chloramphénicol	Traduction	Acétylation, efflux, altération
Quinolones	Ciprofloxacine	Réplication de l'ADN	Acétylation, efflux, altération
Pyrimidines	Triméthoprime	Métabolisme C ₁	Efflux, altération
Sulfonamides	Sulfaméthoxazole	Métabolisme C ₁	Efflux, altération
Rifamycines	Rifampicine	Transcription	ADP-ribosylation, efflux, altération
Lipopeptides	Daptomycine	Membrane cellulaire	Altération
Peptides cationiques	Colistine	Membrane cellulaire	Efflux, altération

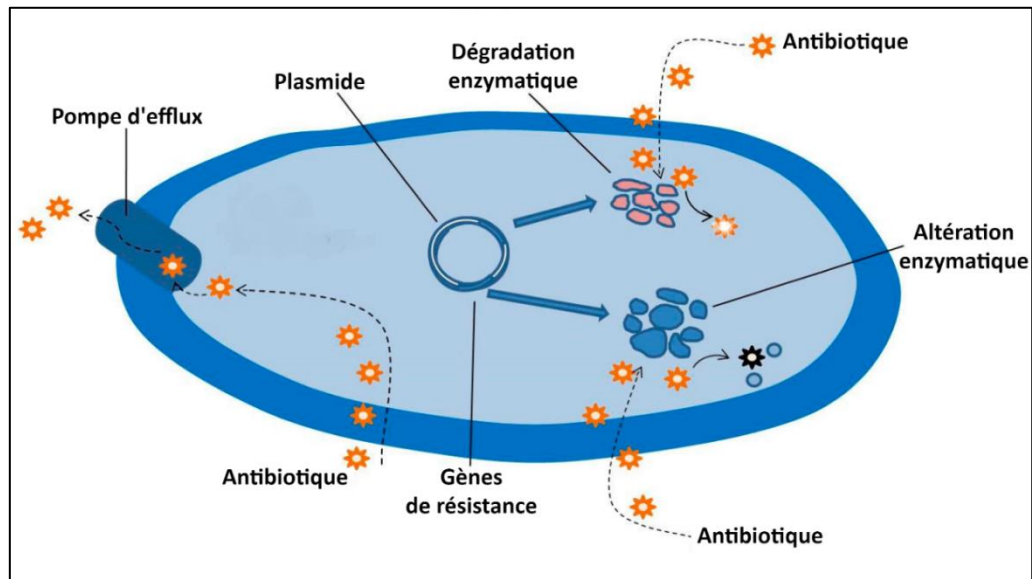


Figure 4 : Mécanismes majeurs de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Chandra *et al.*, 2017).

3.3. Problématique environnementale et médicale de la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques représente la cause de centaines de milliers de décès chaque année, ce qui a conduit l'OMS à la reconnaître comme une menace sanitaire mondiale majeure (WHO, 2014). La lutte contre le développement de la résistance aux antibiotiques a principalement pris place dans les milieux cliniques, communautaires et aussi en milieux agricoles, ces dernières années. Le rôle de l'environnement en tant que source et voie de diffusion de la résistance est de plus en plus reconnu, mais sa compréhension reste encore limitée (Bengtsson-Palme *et al.*, 2018). Un nombre croissant d'infections nosocomiales sont désormais causées par des agents pathogènes multi-résistants, ce qui rend le traitement au fur et à mesure difficile et le choix des antibiotiques de plus en plus limité (Hsieh et Amin, 2016).

Les bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent atteindre les humains (i) indirectement le long de la chaîne alimentaire par consommation d'aliments contaminés (ex. viande, œufs,

lait) ou de produits dérivés (ex. produits laitiers), et (ii) 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. La transmission indirecte par la chaîne alimentaire est une voie d'accès plus longue et plus complexe (Figure 5) (Founou *et al.*, 2016).

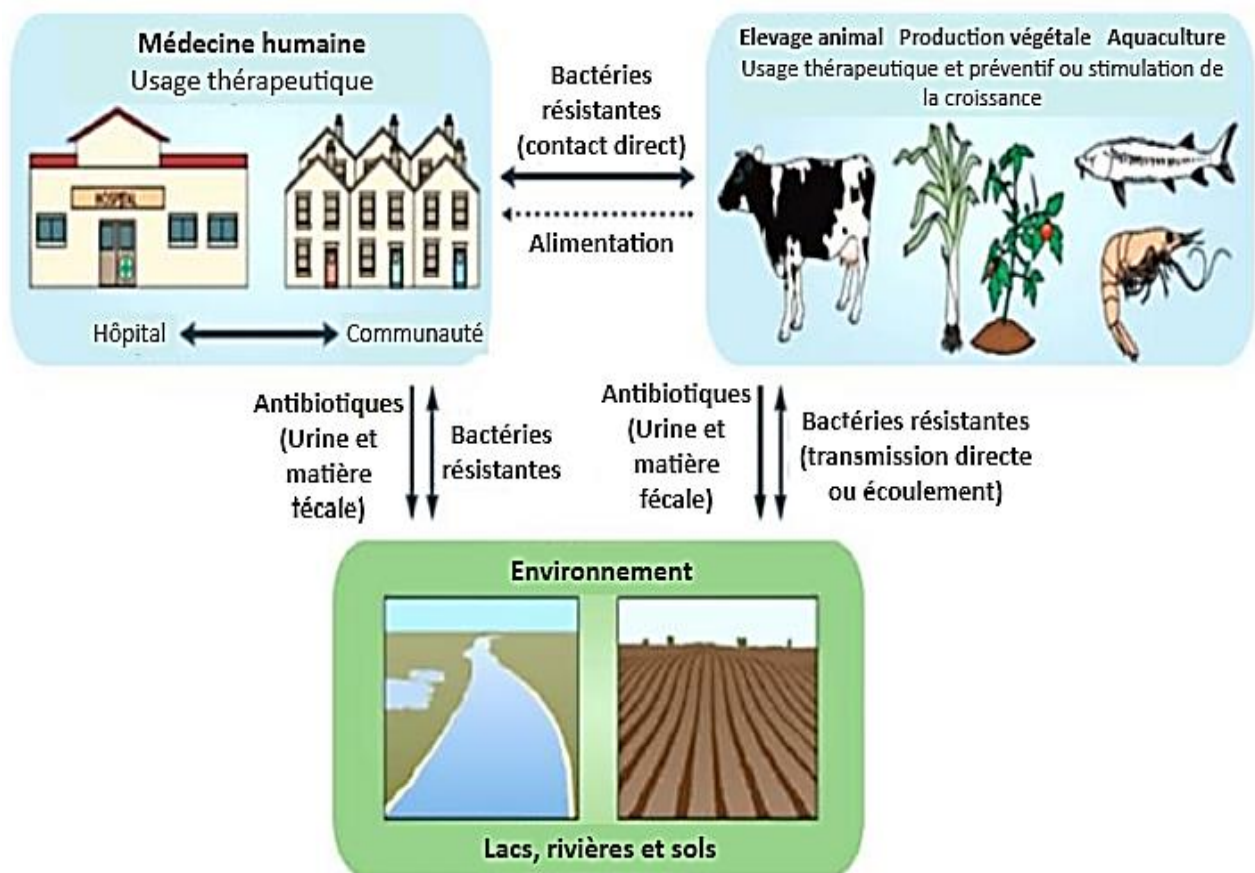


Figure 5 : Utilisation des antibiotiques et différentes voies de transmission de la résistance aux antibiotiques dans la chaîne de production alimentaire (Founou *et al.*, 2016).

4. Biofilms en relation avec les aliments

La présence de biofilms en industrie alimentaire, environnement idéal pour leur développement, peut entraîner une réduction de la durée de vie des produits, des pertes économiques et être responsable de transmission d'agents pathogènes humains (**Birkenhauer et Neethirajan, 2015**). Le danger le plus marqué est lorsqu'un agent pathogène particulièrement indésirable (Par exemple : *Escherichia coli* dans la transformation des aliments, *Legionella* dans les tours de refroidissement, *Pseudomonas* dans l'élevage de volailles) pénètre dans un système et s'attache à ce dernier en formant un biofilm, il devient extrêmement difficile à éliminer et à contrôler (**Cloete et al., 2009**). Les microorganismes capables de former des biofilms peuvent être transmis par le biais de plusieurs sources telles que l'eau, les aliments crus, les animaux, tout au long de la chaîne de production alimentaire. Ils persistent même quand tous les protocoles de désinfection nécessaires sont appliqués, surtout dans le cas des industries laitières (**Gutiérrez et al., 2016**).

4.1. Définition d'un biofilm

Les biofilms sont généralement définis comme des agrégats de microorganismes dans lesquels les cellules sont enrobées d'une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) et qui adhèrent les unes aux autres et/ou à une surface (**Flemming et al., 2016**). Les bactéries sous forme de biofilm sont connues pour avoir un taux de croissance et une physiologie différents de leurs homologues planctoniques. Des études ont montré que les bactéries biofilmogènes peuvent se développer avec moins d'oxygène, moins de nutriments et à une température réduite: conditions souvent retrouvées dans les environnements de transformation et de stockage des aliments (**Costerton et Lappin-Scott, 1995; McLandsborough, 2015**). Parmi les conditions qui affectent le développement du biofilm figurent la température, le pH, les niveaux d'O₂, l'hydrodynamisme, l'osmolarité, la présence d'ions spécifiques, de nutriments et de facteurs dérivés de l'environnement biotique (**Goller et Romeo, 2008; Flemming et al., 2016**).

Afin de tolérer les changements environnementaux, la population bactérienne a développé un mécanisme de détection appelé quorum sensing "QS" où la communauté perçoit, réagit et modifie collectivement son comportement par le biais des autoinducteurs (AI), dont la concentration augmente proportionnellement avec la densité cellulaire (**Figure 6**).

Le QS a été introduit pour décrire le phénomène de luminescence et l'activité élastase chez les bactéries à Gram négatif *Vibro fischeri* et *Pseudomonas aeruginosa*, respectivement. Grâce à ces molécules, une communication de cellule à cellule est réalisée et joue un rôle important dans la formation de biofilms, la production d'EPS, la bioluminescence, la production de pigments et de sidérophores, la sécrétion des facteurs de virulence (toxine, hémolysine, enzymes, résistance aux antibiotiques), la résistance aux métaux et la dégradation des hydrocarbures aromatiques (Gray et al., 1994 ; Prabhu et al., 2019).

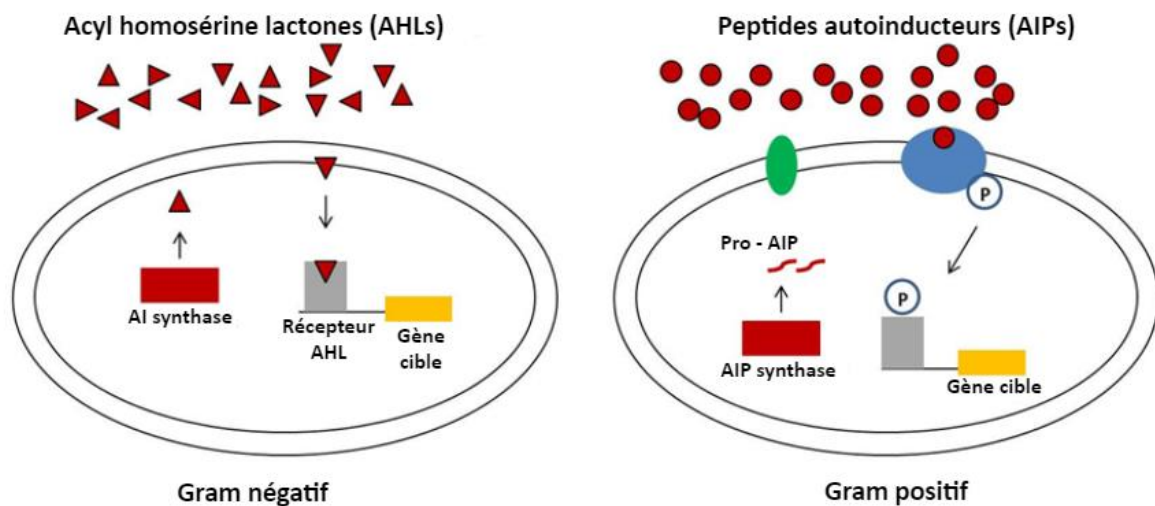


Figure 6 : Systèmes « quorum sensing » chez les bactéries

- Les bactéries à Gram négatif (à gauche) sécrètent des AHLs (triangles rouges) qui, à des concentrations seuil, pénètrent dans les cellules et activent le récepteur AHL apparenté et induisent l'expression des gènes régulés par le QS. Les bactéries Gram positif (à droite) produisent des AIP matures (cercles rouges) qui interagissent davantage avec un récepteur transmembranaire d'histidine kinase activant l'expression du gène cible via l'autophosphorylation du régulateur transcriptionnel (Ivanova et al., 2013).

4.2. Étapes de formation d'un biofilm

Le processus de formation et de développement du biofilm est très complexe, il permet le passage des cellule microbiennes du mode planctonique en mode sessile (**Okada *et al.*, 2005**). Il se déroule en quatre principales étapes (**Figure 7**), dans lesquelles les cellules subissent des changements morphologiques et physiologiques (**Wai *et al.*, 1998**).

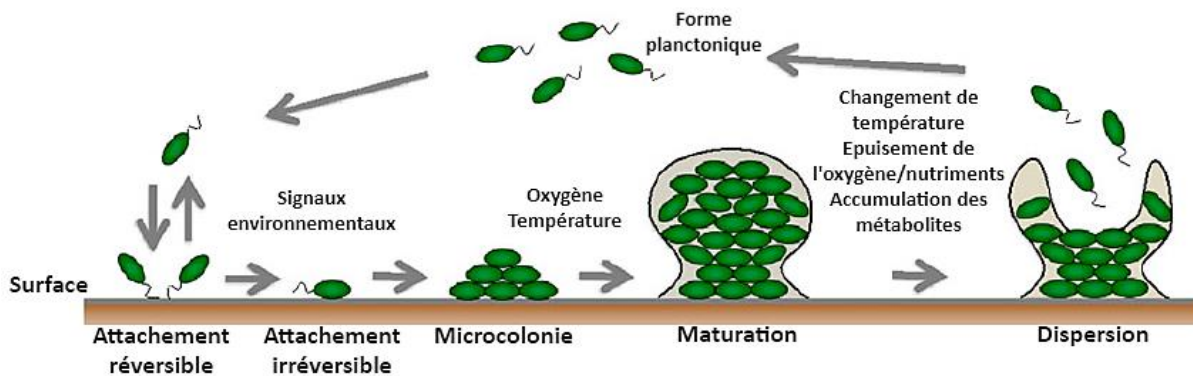


Figure 7 : Etapes de formation d'un biofilm et facteurs influençant (**Toyofuku *et al.*, 2016**).

4.2.1. Attachement

Avant que les bactéries ne viennent au contact du support, un mélange complexe encore mal caractérisé, composé de protéines, de glycoprotéines et de nutriments organiques, forme un film de conditionnement sur la surface. Cette zone riche en nutriments va favoriser l'étape de l'attachement (**Figure 7**). L'attachement initial des bactéries au support est aussi facilité par les forces hydrodynamiques, le chimiotactisme et les propriétés physicochimiques de la surface du support et de la bactérie (**Donlan et Costerton, 2002; Muhsin *et al.*, 2015**). Les forces hydrodynamiques vont servir essentiellement au déplacement de la bactérie dans le milieu et au rapprochement aléatoire de la cellule vers le support. Les forces de cisaillement et les conditions de flux vont influencer sur la densité et l'épaisseur du biofilm. Le chimiotactisme va, quant à lui, permettre un rapprochement plus spécifique entre la bactérie et la surface. Enfin, des interactions non spécifiques (électrostatiques, Van der Waals, énergie de surface et acide-base de Lewis) vont exercer un jeu d'attraction-répulsion. Les appendices tels que les fimbriae, pili et flagelles renforcent

l'interaction entre les bactéries et la surface de fixation. A noter que les microorganismes se fixent mieux aux surfaces hydrophobes et non polaires comme le Téflon et d'autres plastiques, qu'aux surfaces hydrophiles et polaires comme les métaux et le verre. Après une fixation de micro-organismes à une surface biotique ou abiotique se produit, se produit un attachement stable irréversible (**Jouenne, 2008; Carniello et al., 2018**).

4.2.2. Formation des micro-colonies

Lorsque les bactéries attachées se divisent forment des micro-colonies et avec l'augmentation de la densité cellulaire, les signaux chimiques du QS peuvent atteindre des niveaux suffisants pour activer la maturation du biofilm de manière coordonnée (**Hall-Stoodley et al., 2004; Solano et al., 2014**).

4.2.3. Maturation

Le biofilm mature comprend des micro-colonies bactériennes en forme de champignon entourées d'une matrice d'EPS et séparées par des canaux. Dans la plupart des biofilms matures, l'EPS représente plus de 90% de la masse sèche. Les composants EPS comprennent des polysaccharides, des acides nucléiques, des protéines, des lipides et d'autres biopolymères. Les canaux d'eaux sont considérés comme un système circulatoire, distribuant les nutriments et faisant sortir les déchets des micro-colonies du biofilm (**O'Toole et al., 2000 ; Toyofuku et al., 2016**).

4.2.4. Dispersion

La dispersion des biofilms bactériens peut être divisée en trois phases : détachement des cellules, translocation des cellules vers un nouvel emplacement et attachement des cellules à un nouveau substrat. En général, les mécanismes de dispersion peuvent être divisés en deux grandes catégories : la dispersion active qui fait référence aux mécanismes initiés par les bactéries elles-mêmes et la dispersion passive médiée par des conditions externes (**Kaplan, 2010**). Ces dernières concernent en général l'épuisement des nutriments, le stress oxydatif ou nitrosatif, la disponibilité des sources de fer et de carbone ou encore des facteurs de l'hôte tels que les sels biliaires (**Petrova et Sauter, 2016**). Les communautés microbiennes au sein du biofilm produisent différentes enzymes saccharolytiques qui aident à libérer la surface des cellules : *Escherichia coli* produit de la N-acétyl-héparosane lyase, *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* produisent l'alginate lyase et *Streptococcus* qui produit de la

hyaluronidase. Elles régulent également l'expression des protéines liées à la formation de flagelles pour se déplacer vers un nouveau site (**Jamal et al., 2017**).

D'autre part, le phénomène de quorum quenching (QQ) consiste en la dégradation enzymatique des molécules chimiques du QS afin d'éviter leur accumulation dans l'environnement et d'inhiber le changement d'expression des gènes. Il prévient donc la production de facteurs de virulence, y compris les biofilms (**Baselga et al., 1994; Paluch et al., 2020**). Les caractères phénotypiques des cellules sont nettement affectés par la dispersion du biofilm. Les cellules dispersées ont la capacité à retenir certaines propriétés du biofilm, comme la résistance aux antibiotiques. Les cellules dispersées peuvent retourner rapidement au mode planctonique (**Muhsin et al., 2015**).

4.3. Les biofilms et la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques et aux antimicrobiens est une des propriétés émergentes des biofilms (**Flemming et al., 2016**). La compréhension des mécanismes impliqués est nécessaire; afin de développer des stratégies et des méthodes de prévention et de contrôle de la formation de biofilms sur des surfaces importantes pour les pratiques médicales et industrielles (**Jiang et Pace, 2006**). Les biofilms mixtes (polymicrobiens) composés de plusieurs espèces sont généralement plus résistants aux antibiotiques que ceux composés d'une seule espèce (**Giaouris et al., 2013**); mais les principaux mécanismes responsables de la résistance peuvent être liés aux éléments suivants: (i) une pénétration retardée de l'agent antimicrobien à travers la matrice du biofilm, (ii) une modification du taux de croissance des cellules du biofilm, et (iii) d'autres changements physiologiques dus au mode de croissance du biofilm (**Donlan et Costerton, 2002**).

Les changements physiologiques se produisent en raison des effets de la privation d'oxygène ou de nutriments, en particulier dans les couches plus profondes du biofilm. Par exemple, la privation d'oxygène et la faible activité métabolique dans les biofilms rendent *P. aeruginosa* plus tolérant aux antibiotiques (**Wilkins et al., 2014; Algburi et al., 2017**). Le manque d'oxygène (**Batoni et al., 2016**) et les EPS (**Khan et al., 2010**) ont été suggérés comme facteurs conférant la tolérance aux aminosides dans certains biofilms. Les agents antimicrobiens peuvent être piégés dans la matrice de biofilm et chélatés par des enzymes inactivantes. Il a été observé que l'ampicilline est rapidement détruite par les β -lactamases dans les biofilms de *Klebsiella pneumoniae* (**Anderl et al., 2000**).

Comme la plupart des agents antimicrobiens ciblent les cellules à croissance rapide, le taux de croissance peut jouer un rôle important. La pénicilline, par exemple, n'élimine pas les cellules non croissantes mais certaines nouvelles β -lactamines (céphalosporines et carbapénèmes), les aminoglycosides et les fluoroquinolones en sont capables (**Del Pozo et Patel, 2007**).

Plusieurs études ont mentionné l'implication des pompes à efflux dans la résistance aux antibiotiques, à la fois directement, via l'extrusion de ces substances et indirectement, par la formation de biofilm (**Reza et al., 2019**). Les pompes d'efflux sont généralement composées de trois parties de l'extérieur vers l'intérieur : protéine du canal de la membrane externe, protéine de fusion et protéine d'efflux de la membrane cytoplasmique. À l'heure actuelle, l'effet régulateur du QS sur l'expression de la pompe d'efflux a été confirmé. Le système QS lui-même est également affecté par le niveau d'expression des pompes (**Zhao et al., 2020**). Elles peuvent être spécifiques à un seul substrat ou peuvent exporter une large gamme de substrats de structures diverses. Il existe cinq superfamilles de pompes d'efflux associées à la multi-résistance aux antibiotiques : MATE, SMR, MFS, ABC et RND (cette dernière a été retrouvée seulement chez des bactéries à Gram négatif). Les pompes d'efflux pourraient jouer au moins quatre rôles différents dans la formation du biofilm à savoir : efflux d'EPS et/ou des molécules QS et QQ pour faciliter la formation de la matrice du biofilm et réguler le QS respectivement, régulation indirecte des gènes impliqués dans la formation du biofilm, efflux des molécules nocives telles que des antibiotiques et les intermédiaires métaboliques, et influence de l'agrégation en favorisant ou en empêchant l'adhésion aux surfaces et autres cellules (**Alav et al., 2018**).

Matériel & Méthodes

1. Milieux de culture utilisés

1.1. Milieu M17

Le milieu M17 (**annexe 01**) additionné de 2% (P/V) de lactose (LM17) et ajusté à pH 7 a été utilisé sous les deux formes liquide et solide, par addition d'agar-agar à raison de 2% (P/V). Ce milieu est considéré comme favorable à l'isolement et à la culture de la plupart des coques de bactéries lactiques (**Terzaghi et Sandine, 1975**). Il a été rapporté que la gélose M17 est adaptée à l'isolement sélectif de *Streptococcus thermophilus* à partir du yaourt, car le Bêta-glycérophosphate de sodium exerce un effet tampon et supprime le développement de *Lactobacillus bulgaricus* (**Shankar et Davies, 1977**). Elle est recommandée par la fédération internationale du lait (FIL) (**IDF, 1981**).

1.2. Milieu Mueller-Hinton

Le milieu Mueller-Hinton (**annexe 01**) a été d'abord élaboré pour le développement des espèces de *Neisseria* pathogènes (**Mueller et Hinton, 1941**). L'inclusion d'amidon assure l'absorption des éléments toxiques pendant la croissance ainsi que la croissance même à partir d'un très faible inoculum (**Olsen et Scott, 1946**). L'utilisation principale de la gélose Mueller-Hinton concerne le test de sensibilité aux antimicrobiens (AST). Il est devenu le milieu standard pour la méthode Bauer-Kirby (**Bauer et al., 1966; Ryan et al., 1970**) et est spécifié par le CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). La gélose Mueller-Hinton Oxoid™ répond aux exigences de l'OMS (**WHO, 1961; WHO, 1977**).

Remarque: Dans le présent travail, les milieux M17 et Mueller-Hinton ont été utilisés seulement dans les premiers essais d'isolement à partir du pâté de poulet et du camembert.

1.3. Milieu MRS

La formulation du milieu MRS (**annexe 01**) a été développée par de Man, Rogosa et Sharpe (**De Man et al., 1960**) afin de remplacer un produit variable, le jus de tomate et en même temps apporter un milieu favorisant la croissance des lactobacilles en général, y compris ceux qui présentaient un faible développement sur d'autres milieux déjà existants. Il donne une croissance plus abondante de toutes les souches de lactobacilles, spécialement les plus exigeantes des espèces *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus fermenti*. Ce milieu sous les deux formes solide et liquide concerne les genres suivants : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*. La sélectivité peut être altérée par l'ajustement du pH. Les

lactobacilles tolèrent un pH plus bas que les streptocoques (pH 5.0-6.5), avec les pedicocques et les leuconostocs qui se développent mieux à cet intervalle (**Reuter, 1985**).

Le bouillon MRS peut être utilisé pour des tests d'identification des lactobacilles tels que la dépendance à la température et la croissance en présence de 4% de NaCl et de 0.4% de Teepool (**Sharpe et al., 1966**).

1.4. Trypticase Soja Agar

La gélose Trypticase Soja (TSA) (**annexe 01**) est un milieu solide à usage général, contenant deux peptones, favorisant la croissance d'une grande variété de microorganismes. Il convient à la culture des germes aérobies et anaérobies. Cette gélose est recommandée comme milieu de référence pour comparer les milieux sélectifs et mesurer le degré d'inhibition vis-à-vis des microorganismes recherchés et/ou contaminants (**Anonyme, 1987**). Enfin, les deux formes solide et liquide (TSB) sont conformes à des formulations détaillées dans diverses pharmacopées internationales (**British Pharmacopoeia, 2000; Japanese Pharmacopoeia, 2006; US Pharmacopoeia, 2008; European Pharmacopoeia, 2008**).

2. Echantillons étudiés

Au total, cinq (05) échantillons de produits laitiers ont été traités durant les trois (03) semaines de stage pratique effectué du 25.02.2020 au 15.03.2020 dans les laboratoires du département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, au niveau du site III de l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. Ces échantillons dont la description est listée dans le **tableau IV** ont été obtenus à partir de différents points de vente au niveau de la ville dont des superettes et un magasin de produits laitiers traditionnels. Ce choix repose sur le fait que ces produits sont issus d'animaux ayant surement consommés des antibiotiques (**Hoelzer et al., 2017**).

Tableau IV. Types de produits laitiers utilisés dans la présente étude.

Produit laitier	Type de produit	Date de réception
1 : Beurre	Beurre traditionnel	04-03-2020
2 : Beurre	Beurre industriel	04-03-2020
3 : Fromage	Camembert	11-03-2020
4 : Fromage	Camembert	11-03-2020
5 : Fromage	Fromage frais aromatisé	11-03-2020

3. Détection des isolats antibio-résistants

3.1. Préparation des échantillons et établissement de l'antibiogramme

Ce protocole est le résultat d'une optimisation suite à des essais effectués avec un échantillon de pâté de poulet et un de camembert réceptionnés le 26-02-2020. Les premières dilutions décimalesensemencées ont été réalisées à partir d'une prise d'essai de 10g diluée au dixième (1/10); mais les premiers résultats ont montré un faible développement microbien avec la présence de colonies isolées, indiquant que l'inoculum de départ est trop faible. Suite à ces observations, nous avons procédé à la concentration de la suspension mère (ou la dilution mère) des échantillons concernés par l'analyse (**Tableau IV**). Cette fois-ci, la suspension mère des échantillons a été préparée en utilisant une prise d'essai de 20g, prélevée aseptiquement et diluée au sixième (1/6), dans la peptone saline (annexe 05). A noter que le prélèvement, concernant l'échantillon de camembert a été effectué à partir du cœur après l'élimination de la croûte externe (**Figure 8**). Après homogénéisation par agitation manuelle de la suspension mère, des dilutions décimales de l'ordre de 10^{-2} et 10^{-3} ont été établies dans la peptone saline. Ensuite, un volume de 0.1 ml est prélevé et étalé soigneusement à la surface des milieux TSA et MRS-agar préparés et coulés au préalable en boîtes Pétri. Enfin, des disques d'antibiotiques (**Tableau V**) sont déposés avec une pince stérile, passée à l'éthanol et flambée au bec Bunsen. L'incubation est faite à 37°C pendant 18h avec un prolongement si nécessaire.



Figure 8 : Un échantillon de camembert avant le traitement.

- Les flèches indiquent la zone de prélèvement au niveau du cœur.

Tableau V. Disques d'antibiotiques (Liofilchem®) utilisés dans la présente étude.

Antibiotique	Famille	Concentration
Acide fusidique (FC)	Fusidane-triterpènes	10 µg
Chloramphénicol (C)	Phénicolés	30 µg
Erythromycine (E)	Macrolides	15 µg
Oxacilline (OX)	β-lactames	1 µg
Pénicilline G (P)	β-lactames	10 UI*
Spiramycine (S)	Macrolides	100 µg
Vancomycine (VA)	Glycopeptides	30 µg

*10 UI ≈ 9.83 µg ≈ 0.1 mg

3.2. Lecture et sélection des isolats antibio-résistants

L'antibiogramme consiste à déterminer la sensibilité et la résistance aux antibiotiques d'une bactérie isolée. La diffusion en milieu gélosé de disques imprégnés d'antibiotiques permet de mesurer des diamètres d'inhibition de la croissance bactérienne. Cette croissance s'arrête pour former un halo d'inhibition à l'endroit où la concentration du gradient dans la gélose est égale à la concentration minimale inhibitrice (**Jehl et al., 2015**). Les plus larges zones d'inhibition observées, où les bactéries sont dites sensibles, dépassent les 20 mm. Des zones intermédiaires entre 10 et 13 mm peuvent également être mesurées. Un diamètre inférieur à 10 mm est considéré comme une résistance à l'antibiotique en question (**Pollock et al., 1986**).

Dans le présent travail, la lecture préliminaire effectuée correspondait exactement à celle d'un antibiogramme classique, par la mesure des diamètres des zones d'inhibition avec des diamètres mesurables et là où la bordure est nette (**Traub et al., 1987**). Ensuite, dans les zones présentant une résistance ou celles catégorisées intermédiaires, il a été procédé à la détection des colonies les plus proches possible des disques d'antibiotiques. Quelques colonies présentent dans les zones d'inhibition de certains antibiotiques ont aussi été considérées. Les colonies présélectionnées et pour les distinguer des colonies de levures ont été examinées par un test rapide, à savoir une observation microscopique à l'état frais. Une fois leur forme micro-morphologique est déterminée, elles sont repiquées pour être purifiées et pré-identifiées.

3.3. Purification et pré-identification des isolats

Les colonies des isolats présélectionnés antibio-résistants ont été purifiées par la méthode des quadrants sur les géloses MRS ou TSA. Certaines colonies de type punctiforme et afin de les multiplier ont d'abord subi une culture d'enrichissement sur bouillons MRS ou TSB, puis purifiées sur milieu solide. Toutes les cultures ont été incubées à 37°C et pour les isolats dont aucun développement n'a été observé après 24h, une prolongation de l'incubation a été effectuée à température ambiante pendant 72h.

3.3.1. Étude morphologique

L'étude morphologique constitue la clé de toute identification microbienne, elle concerne la détermination des aspects morphologiques : macroscopiques et microscopiques des souches à identifier (**Guiraud, 1998**).

3.3.1.1. Examen macroscopique

Les microorganismes peuvent présenter des morphologies macroscopiques distinctes lorsqu'ils sont cultivés sur des milieux liquides ou solides. L'apparence macroscopique des bactéries en milieu liquide consiste en la description à l'œil-nu des cultures, en notant leurs caractères culturaux, à savoir la turbidité et la formation d'une pellicule à la surface ou de dépôt au fond du tube. Quant à l'examen macroscopique sur milieux solides, les colonies sont décrites sur la base de leur forme, taille, contour, pigmentation, élévation et texture (**Delarras, 2014**).

3.3.1.2. Examen microscopique

Les bactéries sont examinées au microscope soit à l'état frais ou après fixation et coloration, pour en déterminer respectivement la mobilité, la forme cellulaire, le mode d'association et le Gram (**Delarras, 2014**).

a) Observation à l'état frais

Cette observation est montée en plaçant au centre d'une lame propre soit une fraction d'une colonie émulsionnée dans une gouttelette d'eau distillée stérile, soit une boucle d'une culture en bouillon. La préparation est recouverte d'une lamelle et l'observation se fait immédiatement à l'objectif 40. Les bactéries sont dites mobiles si un mouvement directionnel des cellules est observé sur une distance à travers le champ de vision du

microscope. Le mouvement Brownien qui est un mouvement vibratoire et aléatoire provoqué par les molécules d'eau contre les bactéries est à ignorer (**Benson, 2001**).

b) Observation après coloration de Gram

Cette technique a été conçue par le microbiologiste Danois Hans Christian Gram en 1884. Elle permet de différencier la plupart des bactéries, selon la structure de la paroi et son affinité pour les colorants, en deux groupes : les Gram positif et les Gram négatif. Cette coloration qui est une classique de la microbiologie se déroule dans les étapes suivantes : Un frottis fixé préparé sur une lame propre à partir d'une colonie ou d'une culture en bouillon est coloré par le cristal violet pendant 1 min, puis l'excès est éliminé. La préparation est traitée par la suite deux fois au lugol pendant 30 secondes et est décolorée avec de l'éthanol et lavée rapidement à l'eau distillée. La fuschsine est appliquée pendant 1 min et la lame est lavée soigneusement à l'eau distillée, égouttée sur un papier absorbant et séchée à la flamme jaune du bec. L'observation se fait à l'immersion, en utilisant l'objectif 100. Les bactéries dites « Gram négatives » apparaissent roses tandis que les bactéries dites « Gram positives » sont colorées en violet.

Remarque : La coloration de Gram n'a pas été appliquée dans le présent travail.

4. Confirmation de l'antibio-résistance des isolats

Dans un souci relatif au gain de temps d'une part et à la vérification de l'efficacité du protocole suivi d'autre part, nous avons et avant même d'achever l'étape de pré-identification réalisé à nouveau un antibiogramme sur les premiers isolats détectés antibio-résistants. Pour ce faire, ces isolats conservés à 4°C sont réactivés par repiquage sur TSB et incubés dans un bain-marie réglé à 37°C, jusqu'à l'apparition d'un trouble visible indiquant le début de la phase exponentielle. Le stade de cette pré-culture est très important car, il permet non seulement d'obtenir un inoculum de départ (Inoculum initial) d'une densité proche de 1×10^8 ufc/ml, pour la réalisation de l'antibiogramme, mais aussi les cellules prises en pleine division sont généralement sensibles aux antibiotiques (**Chmara et al., 1991; Argemi et al., 2013**). De ces pré-cultures, un volume de 100 µl est prélevé etensemencé à la surface des géloses TSA et MRS, puis les disques d'antibiotiques sont déposés comme décrits précédemment et les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

Résultats & Discussion

1. Détection des isolats antibio-résistants

Dans la plupart des travaux publiés sur les bactéries alimentaires antibio-résistantes (**GE et al., 2007; Badi et al., 2018; Campedelli et al., 2019**), les méthodes microbiologiques suivies reposent en général sur l'isolement et l'identification de ces bactéries dans un premier temps et la détermination de leur profil d'antibio-résistance s'effectue dans un second temps, par la réalisation d'un antibiogramme. Dans la présente étude, le protocole tel qu'il a été présenté dans la partie "matériel & méthodes" s'est basé sur la détection de ces bactéries directement à partir de l'échantillon, dans une procédure combinant l'isolement à l'antibiogramme. Sachant que les échantillons analysés sont des produits polymicrobiens, alors qu'un antibiogramme devait être réalisé, en utilisant un inoculum standardisé d'une souche pure (**RASRBA, 2011; CLSI, 2018**).

La procédure portée sur la réalisation d'un antibiogramme directement à partir de l'échantillon est parfois suivie dans le domaine médical. Par exemple, il a été constaté que la réalisation d'un antibiogramme directement à partir d'un flacon d'hémoculture positif permet de gagner 12 à 24h de temps (**Kolár et al., 1996**).

Le protocole proposé et après un certain nombre d'essais, nous a permis de constater de visu le phénomène d'antibio-résistance des bactéries incluses dans la matrice des produits alimentaires analysés. Nous rappelons que ces derniers sont des produits laitiers fermentés qui sont élaborés grâce aux activités métaboliques des bactéries lactiques (**Tamime, 2002; Şanlıer et al., 2017**).

Les bactéries lactiques en général et les probiotiques en particulier sont soumis à des réglementations contenues dans la législation alimentaire générale, selon lesquelles ils doivent être sans danger pour la santé humaine et animale. Aux États-Unis, les micro-organismes utilisés à des fins de consommation devraient avoir le statut GRAS (Generally Regarded As Safe), c'est-à-dire : "microorganismes sécuritaires de grade alimentaire", réglementé par la FDA (Food and Drug Administration). En Europe, l'EFSA (European Food Safety Authority) a introduit le terme de QPS (Qualified Presumption of Safety). Le concept QPS implique certains critères supplémentaires de l'évaluation de la sécurité des suppléments bactériens, y compris les antécédents d'utilisation sécuritaire et l'absence de risque de résistance acquise aux antibiotiques (**Talon et Leroy, 2011; Markowiak et Śliżewska, 2017**). La sensibilité des souches industrielles telles que les bactéries lactiques aux antibiotiques demeure en effet un critère de sécurité très important.

1.1. Détection à partir des échantillons de beurre

Pour les résultats des échantillons de beurre, nous avons remarqué que les bactéries contenues dans l'échantillon du beurre industriel présentent une sensibilité à la majorité des antibiotiques testés, avec une zone d'inhibition supérieure à 20 mm. Quelques résistances ont cependant été observées et 4 isolats ont été retenus dans les zones de la vancomycine, l'interférence entre vancomycine et pénicilline, la zone de l'érythromycine et aussi la spiramycine. La sensibilité observée peut être expliquée par les bonnes pratiques de fabrication industrielle visant à utiliser des ferments bien sélectionnés et sensibles aux antibiotiques.

Quant aux résultats du beurre traditionnel observés sur le milieu TSA et qui sont relatifs à la suspension mère, nous avons noté un développement abondant de différents types de colonies sur la totalité de la gélose (**Figure 9**) montrant ainsi une résistance, en relation avec une densité élevée de l'inoculum. L'effet inoculum ou plutôt la taille de l'inoculum et sa standardisation constituent un point crucial dans la réalisation d'un antibiogramme, surtout quand il s'agit de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ou bactéricide (CMB), ainsi que des doses dans le cas de traitement clinique. L'inoculum est en effet censé être standardisé à l'étalon 0.5 de McFarland, qui correspond à une densité de 1.5×10^8 UFC/ml. Cette densité initiale est requise pour l'inoculum bactérien, pour le test de sensibilité aux antibiotiques (**Lozano et al., 2018**). Dans le cas du présent travail et comme il a été sus-indiqué, l'inoculum et vu sa nature (suspension d'échantillon alimentaire), n'a pas été standardisé. Donc, les résultats observés sur une gélose comme TSA représentent une suite logique, en particulier avec un échantillon comme le beurre traditionnel. Ce produit fermenté est composé principalement de bactéries lactiques mésophiles telles que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *cremoris* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* impliquées dans le métabolisme du citrate qui donne le diacétyle, un contributeur majeur à la saveur du beurre (**Wilbey, 2002; Savadogo et Traore, 2012**). Le beurre traditionnel peut aussi héberger des *Enterococcus*, puisque certaines espèces de ce genre comme *E. durans* et *E. faecium* sont considérées parmi les plus rencontrées dans le lait cru (**Giraffa, 2003**). Dans ce contexte, **Sánchez-Valenzuela et al. (2013)** ont rapporté avoir isolé à partir de différents aliments fermentés traditionnels des souches multi-résistantes d'*E. faecium* et *E. faecalis*. Cet écosystème traditionnel peut aussi renfermer une flore secondaire multiple, en relation avec sa chaîne de production. Nous signalons à l'occasion

avoir noté une flore caractérisée par un dégagement d'une odeur typique de l'indole, indiquant une présence probable de coliformes dans cet échantillon. Comme pour plusieurs produits laitiers, la préparation artisanale et le stockage du beurre dans des conditions non hygiéniques peuvent être la raison entraînant une croissance plus ou moins dense de coliformes dont *Escherichia coli*, par exemple (Meshref, 2010 ; Park *et al.*, 2014).

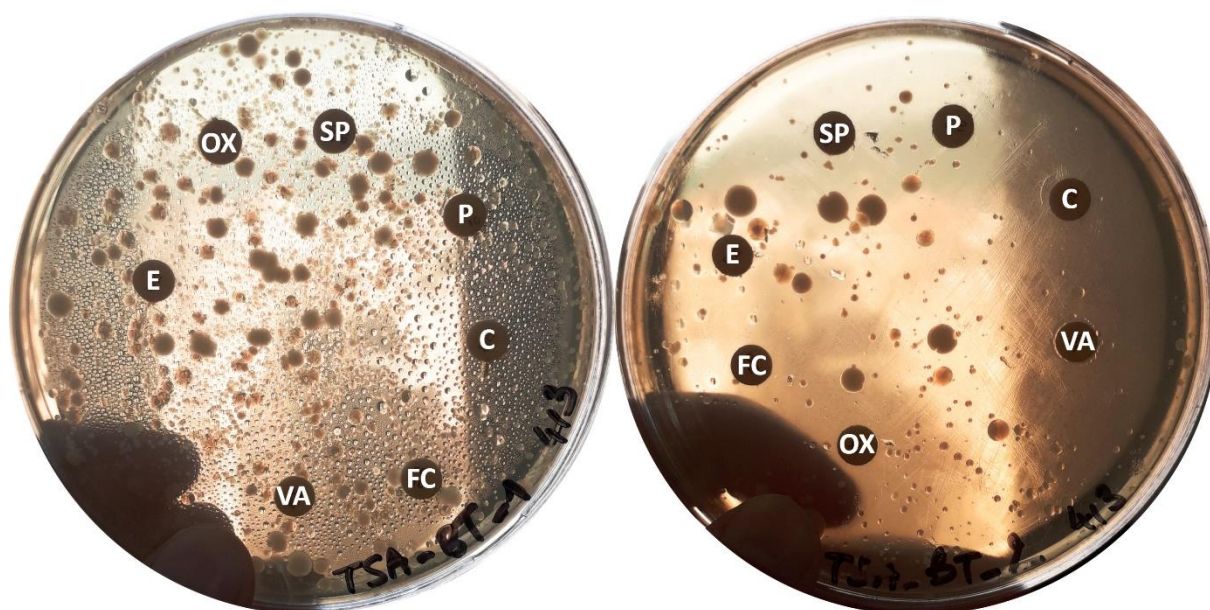


Figure 9 : Aspects de l'antibiogramme de l'échantillon du beurre traditionnel réalisé sur milieu TSA pour les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} , après 18 h d'incubation à 37°C.

Contrairement à la gélose TSA, les résultats du beurre traditionnel sur MRS-agar ont montré un développement microbien bien réparti et d'une densité acceptable (Figure 10). Ceci peut être expliqué par rapport à la sélectivité et à la nature acide du milieu MRS qui favorise la croissance des germes lactiques acidophiles (Rodriguez Medina *et al.*, 1995). Les résultats de cet antibiogramme ont indiqué une résistance aux antibiotiques testés, à l'exception du chloramphénicol (Figure 10). Le chloramphénicol est un antibiotique à large spectre qui empêche la formation de biofilms, mais présente des risques pouvant provoquer une anémie aplasique chez l'homme et sa génotoxicité a été démontrée dans plusieurs essais *in vivo* et *in vitro* (WHO, 1994; WHO, 1995). Par conséquent, son utilisation dans l'élevage des animaux destinés à la consommation humaine est interdite dans de nombreux pays, ce qui peut expliquer la sensibilité des isolats (Calvarese *et al.*, 2006; Lorenzo, 2019).

La résistance des bactéries lactiques à la vancomycine notamment de certains *Lactobacillus* et *Leuconostoc* a été largement signalée dans la littérature (Liu *et al.*, 2009; Goldstein *et al.*, 2015; Sirichoat *et al.*, 2020). Par ailleurs, la susceptibilité des bactéries lactiques à l'érythromycine varie parmi les espèces lactiques (Zonenschain *et al.*, 2009; Thumu et Halami, 2012; Sirichoat *et al.*, 2020). Notons que l'érythromycine est l'antimicrobien le plus largement utilisé en thérapie humaine et animale avec la tétracycline, et les déterminants génétiques impliqués dans la résistance à cet antibiotique sont généralement associés à des éléments génétiques mobiles acquis (Campedelli *et al.*, 2019).

La résistance à l'oxacilline et à l'acide fusidique des pathogènes issus de l'environnement des produits laitiers tels que *Staphylococcus aureus* a également été rapportée (Seixas *et al.*, 2014; Obaidat *et al.*, 2018).

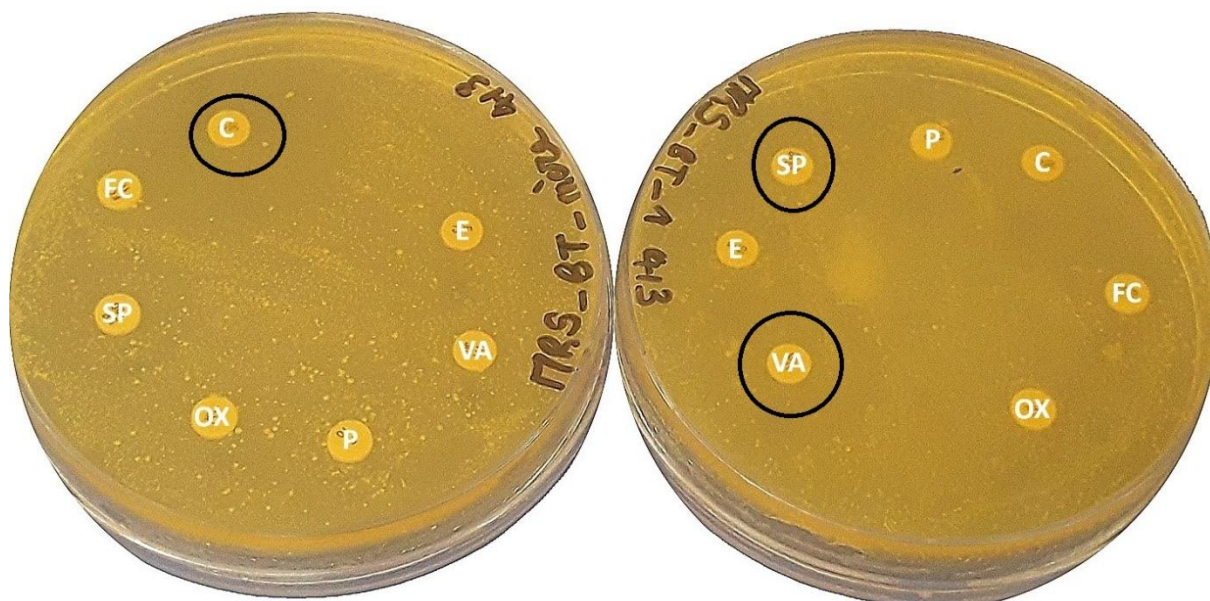


Figure 10 : Aspects de l'antibiogramme de l'échantillon du beurre traditionnel réalisé sur milieu MRS à partir des dilutions mère et 10^{-1} , après 18 h d'incubation à 37°C.

- Les zones encadrées concernent les colonies résistantes prélevées en vue d'une purification et d'une identification.

1.2. Détection à partir des échantillons de fromages

Les échantillons de camemberts traités ont été très souvent dominés par des levures même après une courte durée d'incubation. Les levures sont rencontrées en nombre important dans les fromages, notamment ceux à pâte molle de type Camembert (**Schmidt et Daudin, 1983**). Elles sont considérées comme des contaminants issus du processus de fabrication et peuvent se développer durant le stockage à 10°C et 25°C, pour atteindre des concentrations de 10^6 à 10^8 UFC/g (**Roostita et Fleet, 1996**).

Les zones d'inhibitions ont été observées avec les deux échantillons de camemberts sur les deux milieux TSA et MRS-agar. Les colonies étaient plus homogènes et visibles sur TSA avec absence de contamination par les levures, vu son pH qui est légèrement basique. Les antibiotiques les plus efficaces étant le chloramphénicol, la spiramycine et l'acide fusidique, avec des diamètres atteignant les 30-40 mm (**Tableau VI**). Cette susceptibilité peut être expliquée par le fait que ces antibiotiques ne soient pas mentionnés pour être destinés à un usage animal (**McEwen et Fedorka-Cray, 2002**).

Cependant, une résistance à l'oxacilline est souvent revenue et plusieurs isolats ont été retenus vis-à-vis de cet antibiotique. La piste la plus probable reste *Staphylococcus*, genre bactérien majoritairement connu et rapporté pour posséder un gène de résistance spécifique (*mecA*), en relation avec la résistance aux pénicillines M (mécicilline et oxacilline). Etant donné l'absence de pigmentation dorée caractéristique éliminant l'espèce *S. aureus*, il peut s'agir de *S. epidermidis* ou *S. sciuri*. Ensuite, bien que leur composition soit totalement différente, les mêmes résultats ont été observés avec le fromage frais (**Tableau VI, Figures 11 et 12**), ceci peut donc avoir une relation directe avec la matière première qui est le lait (**Fernandes Dos Santos et al., 2016; Khazandi et al., 2018**) ou le type de ferments utilisés, puisque il s'agit d'une préparation industrielle. L'absence de tests biochimiques laisse toutefois des doutes sur cette orientation de l'identification.



Figure 11 : Aspects de l'antibiogramme de l'échantillon de fromage frais réalisé sur milieu MRS à partir des dilutions mère et 10^{-1} , après 18 h d'incubation à 37°C.
 - Les zones encerclées concernent les colonies résistantes prélevées en vue d'une purification et d'une identification.



Figure 12 : Aspects de l'antibiogramme de l'échantillon de fromage frais réalisé sur milieu TSA à partir des dilutions mère et 10^{-1} , après 18 h d'incubation à 37°C.
 - Les zones encerclées concernent les colonies résistantes prélevées en vue d'une purification et d'une identification.

Tableau VI. Diamètres des zones d'inhibition pour les échantillons de fromages.

Echantillon	Dilution	Gélose	Antibiotique	Diamètre (mm)
Camembert (1)	10^{-1}	TSA	VA	30
			E	35
			FC SP C	40
Camembert (2)	10^{-1}	TSA	C	25
	10^{-2}	TSA	C	30
		MRS	VA FC	20
			C	40
Fromage frais	Mère	TSA	FC SP	20
			VA	25
			C	40
	10^{-1}	MRS	SP	30
			E	
			C	40

2. Pré-identification des isolats retenus

Une pré-identification des premiers isolats a été établie selon l'aspect macroscopique des colonies sur milieu gélosé et l'aspect microscopique des cellules à l'état frais. Ces résultats sont présentés dans le **tableau VIII**. En se référant aux données citées par **Delarras, (2007)**, ces résultats préliminaires et partiels orientent l'identification des isolats I3 et I6 vers la famille des *Enterobacteriaceae*. Les membres de cette famille forment sur le milieu non-sélectif TSA des colonies assez grandes (>1 mm), de forme circulaire blanches à jaunâtres, lisses et brillantes (**Bardet et al., 2017**). A noter également que les colonies observées pour I3 et I8 étaient visqueuses.

L'isolat I25 détecté résistant à la pénicilline a montré un aspect macroscopique similaire aux précédents. Cependant, son aspect à l'état frais a montré des coques associés en grappes, pouvant suggérer des Staphylocoques.

Tableau VII : Résultats de la pré-identification des premiers isolats détectés antibio-résistants. Données adaptées d'après la description de **Delarras, (2007)**, relative aux caractères culturels de certaines souches bactériennes à Gram positif et négatif.

Isolat	ATB ^a	Origine de l'isolat (échantillon)	Aspect microscopique ^b	Aspect macroscopique									
				Sur milieu solide (TSA)									Sur milieu liquide (TSB)
				T°C	Taille (mm)	Forme	Elévation	Transparence	Surface	Consistance	Pigment	Type	
3	SP	Beurre traditionnel	Bâtonnets courts mobiles	37	>1	Circulaire	légèrement convexe	Opaque	Lisse et brillante	Visqueuse	Blanc à jaunâtre	S	Trouble hétérogène avec un dépôt visqueux et production de gaz
6	E		Bâtonnets courts mobiles						Lisse	Crémeuse	Blanc		Trouble homogène
7	FC		Bâtonnets longs						Lisse	Crémeuse	Blanchâtre		Trouble homogène
8	VA	Beurre industriel	Bâtonnets courts	37	>1	Circulaire	légèrement convexe	Opaque	Lisse brillante	Visqueuse	Blanc	S	Dépôt visqueux et production de gaz
25	P	Fromage Frais	Coques associés en grappes	37	>1	Circulaire	convexe	Opaque	Lisse	Crémeuse	Blanc	S	Trouble uniforme

ATB: Antibiotique, TSA: Trypticase Soja Agar, TSB: Trypticase Soja Broth

^a Désigne l'antibiotique auquel la bactérie a été détectée résistante, ^b Après un état frais,

3. Confirmation de l'antibio-résistance de certains isolats

L'isolat I3 détecté résistant à la spiramycine et ayant pour origine le beurre traditionnel a présenté une multi-résistance aux antibiotiques testés, excepté pour le chloramphénicol, avec une zone d'inhibition d'environ 30 mm (**Figure 13**). Cette observation confirme ce qui a été mentionné concernant le large spectre du chloramphénicol, après la lecture du premier antibiogramme réalisé pour la détection.

De plus, une petite zone d'inhibition par la vancomycine a été observée. Celle à proximité de la spiramycine constitue seulement une « interférence » entre cet antibiotique et le chloramphénicol avoisinant. La nappe bactérienne assez visqueuse qui s'est formée confirme à son tour le résultat obtenu après repiquage sur milieu liquide (bouillon) (**Tableau VII**). L'isolat I3 a été conservé pour étudier sa capacité à former des biofilms.

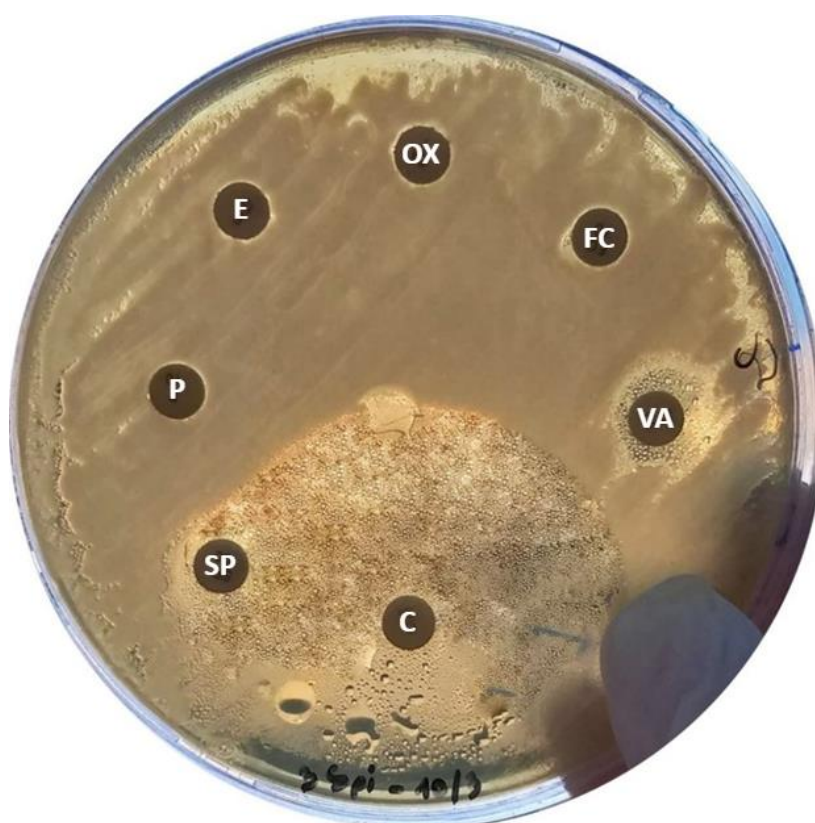


Figure 13 : Antibiogramme de confirmation du profil multi-résistant de l'isolat I3.

- Culture réalisée sur milieu TSA après 18h d'incubation à 37°C.

Les isolats I7 (beurre traditionnel) résistant à l'acide fusidique et I8 (beurre industriel) résistant à la vancomycine ont également montré une multi-résistance après confirmation par un second antibiogramme (**Figure 14**). Cette résistance est représentée par la formation de quelques petites colonies même la surface de tous les disques d'antibiotiques testés.

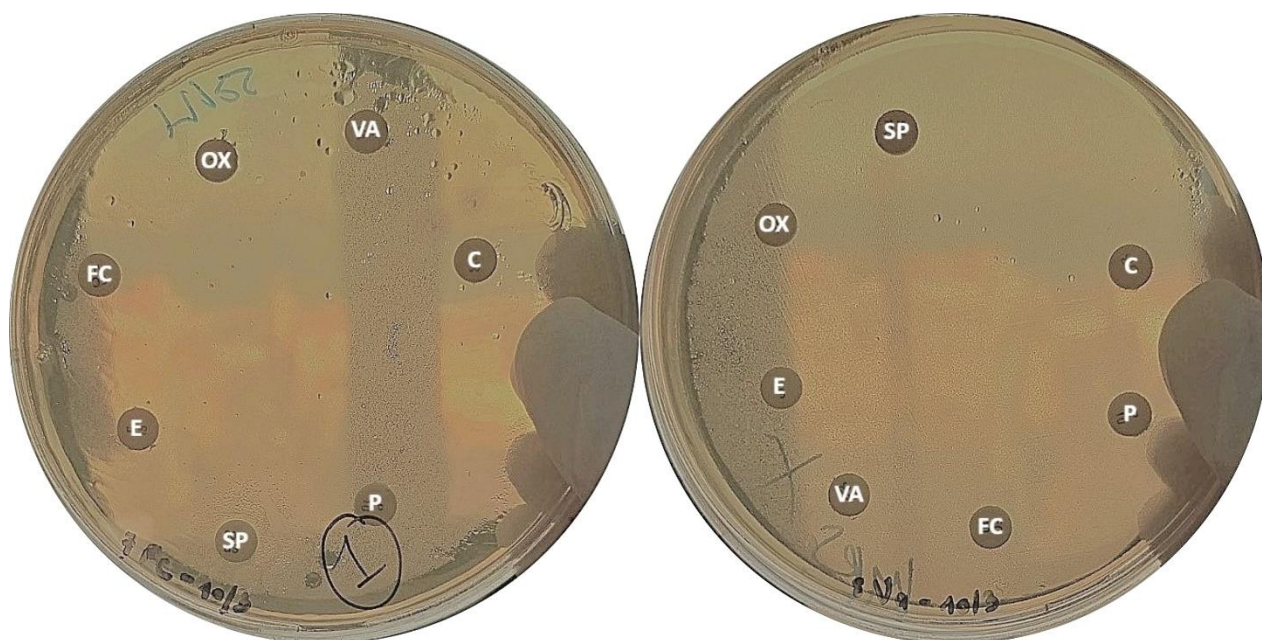


Figure 14 : Antibiogramme de confirmation du profil multi-résistant des isolats I7 et I8.

- Culture réalisée sur milieu TSA après 18h d'incubation à 37°C.

Malgré leur caractère partiel, ces premiers résultats indiquent la présence dans les aliments analysés de bactéries antibio-résistantes. Ce fléau relatif aux bactéries impliquées directement ou indirectement dans la chaîne alimentaire est de plus en plus déclaré comme un danger réel pour la santé (Alanis, 2005; Puig-Peña *et al.*, 2020). L'émergence de la résistance aux antibiotiques couplée à la formation de biofilms chez les bactéries à Gram négatif de la chaîne de production alimentaire ont fait l'objet de nombreux travaux (Li *et al.*, 2015; Mukerji *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2018). La voie de contamination la plus importante en ce qui concerne par exemple, les entérobactéries est la matière fécale,

généralement lors de la traite. Même avec les pratiques de traite modernes, il est impossible d'éliminer cette source de contamination du lait. *Escherichia coli* et d'autres entérobactéries ont souvent été utilisées comme indicateurs de qualité microbiologique et d'hygiène. Parmi les genres que l'on peut citer, *Salmonella* pour le lait cru et ses produits dérivés, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* et *Serratia* pour le lait pasteurisé et/ou réfrigéré. Les fromages sont aussi la cible d'entérobactéries telles que *Citrobacter freundii* (camembert) et *Enterobacter aerogenes* (fromage frais) qui y forment des amines biogènes toxiques pour l'Homme (**Anand et Griffiths, 2011; Rodrigues et al., 2017**). Parmi les antibiotiques majeurs auquel une résistance a été étudiée, nous pouvons citer *Enterococcus* vis-à-vis de la pénicilline, *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* vis-à-vis de l'ampicilline et *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de la méticilline (**Cole et Singh, 2017; Guarascio et al., 2019**). Les cibles principales de toutes les études menées et en cours à ce sujet sont les dits pathogènes « ESKAPE » : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (**Bassetti et Righi, 2015; Mulani et al., 2019**).

Dans les produits laitiers fermentés, les principaux porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques ne sont pas des *E. coli*, mais plutôt des bactéries lactiques et des *Staphylococcus* spp. (**Wang et al., 2006; Wang et al., 2012**). Le *Staphylococcus* est réputé développer rapidement des résistances aux antibiotiques (**Doyle et al., 2012**). Il faut savoir que ce genre est très souvent mentionné dans les travaux concernant la résistance aux antibiotiques et représente un pourcentage assez important parmi les bactéries à Gram positif (**Wendlandt et al., 2015; Morehead et Scarbrough, 2018**). Concernant les denrées alimentaires, il est le plus souvent associé aux viandes, volailles, œufs, pâtisseries à la crème, pommes de terre et certaines salades. Les souches résistantes issues d'un environnement alimentaire sont souvent formatrices de biofilms (**Marino et al., 2010**).

Présentation d'articles scientifiques

Article 1: The Prevalence, Antibiotic Resistance and Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* in Bulk Ready-To-Eat Foods. Lin Q., Sun H., Yao K., Cai J., Ren Y. & Chi Y., 2019.

Biomolecules, 9(10): 524. Article disponible sur:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6843627/pdf/biomolecules-09-00524.pdf>.

Description de l'étude

- Cette étude qui porte sur trois points majeurs : la prévalence, la résistance aux antibiotiques et la capacité de formation de biofilm par *Staphylococcus aureus* isolé à partir d'aliments en vrac prêts à consommer a été réalisée par Lin et ses collaborateurs de l'université de Sichuan et l'institut de contrôle des aliments et médicaments de Chengdu (Chine). Elle a été publiée en 2019 dans *Biomolecules*.

Justification du choix de l'article

- Cet article a été choisi pour être présenté pour deux principales raisons : la première concerne sa grande étendue, étant donné qu'il englobe différents types d'aliments et la seconde est sa démarche expérimentale assez rapide.

1. Résumé

Les auteurs ont souligné le contexte de l'étude qui concerne la prévalence de *Staphylococcus aureus* dans les aliments en vrac prêts à consommer (produits carnés, laitiers, fruits et légumes, desserts), sa multi-résistance aux antibiotiques (MDR) et sa capacité à former un biofilm. Sur un total de 54 isolats retenus, une prévalence de *S. aureus* a été estimée pour chaque aliment étudié. La majorité des isolats ont été résistants à au moins un antibiotique et trois isolats se sont avérés résistants à la méthicilline. La résistance phénotypique à la pénicilline, à l'érythromycine, à la clindamycine, à la tétracycline et à la clindamycine a été déterminée associée à des gènes de résistance. Enfin, seulement deux isolats avec une forte capacité à former un biofilm ont montré une multi-résistance aux antibiotiques testés.

2. Introduction et objectifs

Dans la partie introduction, les auteurs ont décrits les aliments en vrac prêts à consommer comme étant la catégorie d'aliments la plus vendue sur le marché. Ce qui explique leur popularité qui aussi en relation avec leurs qualités gustatives, nutritionnelles et leur préparation pratique sans traitement thermique ou à feu doux. Les auteurs ont indiqué qu'à

cause de la faible intensité de stérilisation et du manque d'emballage, ces aliments pourraient être facilement contaminés par des microorganismes et des toxiques pendant le transport, la vente et le stockage. Les auteurs ont également rapporté que *S. aureus* est considéré comme l'un des principaux pathogènes dont les entérotoxines représentent un danger pour la santé du consommateur et que ce pathogène a été détecté dans certains aliments prêts à consommer tels que les salades de légumes, nouilles cuites, viandes cuites et desserts. Sa résistance aux antibiotiques est très nocive pour la sécurité alimentaire. Cette étude vise donc à estimer la prévalence de *S. aureus* dans ce type d'aliments et à déterminer sa résistance aux antibiotiques, ses gènes de résistance et sa capacité de former un biofilm.

3. Matériel et Méthodes

Ce travail a suivi un protocole accéléré : l'échantillonnage, l'isolement de *S. aureus*, l'identification par système VITEK 2 et séquençage de l'ARNr 16S. La résistance aux antibiotiques a également été évaluée par VITEK 2. Les gènes de résistance ont été déterminés par PCR et l'essai de formation de biofilm a été réalisé par la méthode d'évaluation en microplaque.

Nous trouvons cette partie très intéressante car elle a été rédigée d'une façon détaillée, proposant des méthodes qui peuvent être facilement répétées. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle nous la présentons telle qu'elle a été publiée.

3.1. Echantillonnage

Comme il a été signalé dans le résumé de l'article, les produits analysés sont des aliments en vrac prêts à consommer. Il s'agit de 2160 échantillons dont 1209 produits carnés, 200 produits laitiers, 401 fruits et légumes et 350 desserts, collectés dans la province du Sichuan, en Chine, entre 2013 et 2016. Les échantillons ont été placés dans des sacs stériles, emballés et stockés dans des conteneurs isolés avec de la glace pour être transportés directement au laboratoire et analysés dans un délai de 4h.

3.2. Isolement et identification

La méthode d'isolement et d'identification de *S. aureus* suivie par les auteurs est relativement simple et le protocole utilisé se reporte à celui décrit précédemment par **Wang et al. (2013)**, avec des modifications mineures. En bref, les aliments ont été broyés et un échantillon de 25 g a été placé dans un sac en plastique stérile et rincé manuellement de

400ml d'eau peptonée tamponnée (BPW, Beijing Land Bridge Technology Ltd, China) pendant 2 min puis incubé à 37°C pendant 24h. Une aliquote de 5 ml de produit de pré-enrichissement a été transférée dans 50 ml de bouillon Trypticase Soja (TSB, Beijing Land Bridge Technology Ltd.) à 7.5% de NaCl. Après incubation à 37°C pendant 24h, une boucle de la culture a été appliquée sur des boîtes de gélose Baird-Parker (BPA, Beijing Land Bridge Technology Ltd.) à 5% de jaune d'œuf et de tellurite. Après incubation à 37°C pendant 24h, une ou deux colonies présumées positives à la coagulase pour chaque échantillon ont été sélectionnées et transférées dans des boîtes de gélose Trypticase Soja (TSA, Beijing Land Bridge Technology Ltd.) à 0.6% d'extrait de levure pour une purification supplémentaire. Les souches isolées ont été confirmées en utilisant le système d'identification automatique VITEK 2 (BioMerieux, Lyon, France) et le séquençage de l'ARNr 16S (Shenggong Biotechnology Co., Ltd., Shanghai, China).

3.3. Test de sensibilité aux antibiotiques

Ce test a concerné 17 antibiotiques courants couvrant 13 classes différentes (**Tableau I**). Ces tests ont été réalisés pour la détermination des *S. aureus* multi-résistants (MDR) et Ultrarésistants aux antibiotiques (XDR). La MDR est définie comme une résistance acquise à au moins un agent appartenant à trois classes différentes ou plus et les XDR sont résistants à au moins un agent dans toutes, sauf à deux classes d'antibiotiques ou plus (**Magiorakos et al., 2012**). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de ces 17 antibiotiques ont été évaluées par le système VITEK 2 (BioMerieux), en utilisant la carte de test AST-GP67 selon les instructions du fabricant. Les seuils d'interprétation pour la sensibilité et la résistance étaient conformes aux directives du CLSI en 2018.

Tableau I : Classes et agents antibiotiques utilisés dans cette étude.

Classe	Antibiotique
Pénicillines	Pénicilline
Aminoglycosides	Gentamicine
Ansamycines	Rifampicine
β-lactamines anti-staphylococciques	Oxacilline
	Céfoxitine
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine
	Lévofloxacine
	Moxifloxacine
Inhibiteurs du métabolisme de l'acide folique	Triméthoprim/Sulfaméthoxazole
Glycopeptides	Vancomycine
	Tigécycline
Macrolides	Erythromycine
Lincosamide	Clindamycine
Oxazolidinones	Linézolide
Streptogramines B	Quinupristine/Dalfopristine
Tétracyclines	Tétracycline
Macrolides-Lincosamides-Streptogramines B	Clindamycine (résistance inductible)

3.4. Détection des gènes de résistance

L'ADN génomique a été extrait au moyen d'un kit d'extraction (TIANGEN, Beijing, China), suivant les instructions du fabricant. Les isolats de *S. aureus* ont été testés par PCR pour le gène de résistance à la méthicilline (*mecA*), afin de confirmer la présence de *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM). D'autres gènes de résistance aux antibiotiques (*blaZ*, *ermC*, *ermA*, *tetK*, *tetM* et *tetL*) ont également été étudiés. Toutes les séquences d'amorces sont présentées dans le **tableau II**. Les réactions de PCR ont été effectuées en utilisant un thermocycleur à 96 puits (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China). Chaque réaction de PCR contenait 1 µL (10 µM) d'amorce sens, 1 µL (10 µM) d'amorce reverse, 25 µL de Taq HS Perfect Mix (TaKaRa, Beijing, China) et 1 µL d'extrait d'ADN. Le volume final était de 50 µL, constitué en ajoutant de l'eau stérile. Les réactions réalisées ont été les suivantes : une étape de dénaturation initiale de 94°C pendant 5 sec, suivie de 35 cycles de 94°C pendant 5 sec, 55°C pendant 25 sec et 68°C pendant 20 sec. Les produits de PCR ont été colorés et soumis à une électrophorèse dans un gel d'agarose à 1.5% et à 120 V pendant 20 min.

Tableau II : Gènes de résistance aux antibiotiques et amorces utilisées dans cette étude.

Antibiotiques	Gène cible	Amorce (5'-3')	Taille (pb)
Pénicilline	<i>blaZ</i>	F: CAAAGATGATATAGTTGCTTATTC R: CATATGTTATTGCTTGACCAC	355
Céfoxitine Oxacilline	<i>mecA</i>	F: AACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAG R: ATTGCTGTTAATATTTTTGAGTTGAA	173
Clindamycine (inductible)	<i>ermA</i>	F: GTTCAAGAACAATCAATACAGAG R: GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	421
Erythromycine Clindamycine	<i>ermC</i>	F: GCTAATATTG TTTAAATCGTCAATTCC R: GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	572
	<i>tetL</i>	F: TCGTTAGCGTGCTGTCATTC R: GTATCCCACCAATGTAGCCG	267
Tétracycline	<i>tetM</i>	F: GTGGACAAAGGTACAACGAG R: CGGTAAAGT TCG TCACACAC	406
	<i>tetK</i>	F: TCGATAGGAACAGCAGTA R: CAGCAGATCCTACTCCTT	169

3.5. Essais de formation de biofilm

La méthode utilisée par les auteurs est celle de la coloration au cristal violet décrite par Jitendra Patel avec des modifications mineures. Des cultures individuelles « overnight » de *S. aureus* réalisées sur TSB ont été ajustées à la densité de l'étalon 0.5 McFarland. La suspension a ensuite été diluée au 1:10 et 200 µl de la suspension diluée ont été déposés dans une plaque de micro-titrage en polystyrène stérile à 96 puits. Un milieu de croissance

dépourvu d'inoculum bactérien a servi de témoin négatif. Après 48h d'incubation à 28°C, 200 µl de culture ont été complètement éliminés par aspiration et les puits ont été lavés cinq fois avec de l'eau distillée stérile. Les plaques ont été séchées à l'air libre pendant 20 min, et 200 µl d'une solution de cristal violet (0.41% (P/V), Phygene, Fujian, China) ont été ajoutés avant d'être incubées à température ambiante pendant 20 min. Après le lavage et le séchage des plaques à l'air libre, 200 µl d'éthanol à 95% ont été ajoutés pour dissoudre le cristal violet. La capacité de formation de biofilm a été caractérisée en mesurant la densité optique à 570 nm (OD₅₇₀) avec un spectrophotomètre pour microplaques (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). La souche ATCC 6538 de *S. aureus* a été utilisée comme souche de référence. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicate. La valeur seuil (DOc) a été définie comme la moyenne de la DO des témoins négatifs plus trois fois l'écart-type des témoins négatifs. Les souches ont été classées en quatre catégories: non productrices de biofilm lorsque OD/ODc ≤ 1, faibles productrices de biofilm lorsque 1 < OD/ODc ≤ 2, productrices modérées de biofilm lorsque 2 < OD/ODc ≤ 4 et fortes productrices de biofilm lorsque 4 < OD/ODc.

3.6. Analyse statistique

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS 22.0 (IBM company, Armonk, NY, USA) pour Windows.

4. Résultats et Discussion

Les résultats sont bien détaillés puisque ils ont été décrits dans le texte et présentés aussi sous forme de tableaux et d'une figure. La discussion s'est faite au fur et à mesure.

4.1. Prévalence de *Staphylococcus aureus* dans les aliments en vrac prêts à consommer

Tout d'abord, il a été constaté que 42 (1.9%) échantillons ont été détectés positifs pour *S. aureus* soit 24 produits carnés (2.0%), 4 produits laitiers (2.0%), 7 fruits et légumes (1.8%) et 7 desserts (2.0%) (**Tableau III**). La présence de *S. aureus* a été presque la même dans les produits laitiers, les fruits et légumes et les desserts, et a été nettement plus élevée dans les produits à base de viande. Au total, 54 isolats de *S. aureus* ont été récupérés. La prévalence de *S. aureus* dans les produits à base de viande, les produits laitiers, les fruits et légumes et les desserts a été de 2.6% (31/1209), 3.0% (6/200), 2.2% (9/401) et 2.3% (8/350), respectivement. Après cette première présentation des résultats relatifs à la prévalence de *S. aureus* dans les aliments prêts à consommer étudiés, les auteurs ont procédé à la citation

de travaux similaires, notamment ceux réalisés sur des préparations prêtes à consommer à base de viande. Dans ce cadre, l'étude de **Yang et al. (2018)** [Yang, S.; Pei, X.; Yang, D.; Zhang, H.; Chen, Q.; Chui, H.; Qiao, X.; Huang, Y.; Liu, Q. **Microbial contamination in bulk ready-to-eat meat products of China in 2016. Food Control. 2018, 91, 113–122**], réalisée en chine a fait référence en premier lieu. En second lieu, les auteurs ont cité les travaux de **Harada et al. (2018)** [Harada, T.; Taguchi, M.; Kawahara, R.; Kanki, M.; Kawatsu, K. **Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Bacterial Pathogens in Ready-to-Eat Foods Retailed in Osaka Prefecture, Japan. J. Food Prot. 2018, 81, 1450–1458**], une étude japonaise rapportant aussi sur la contamination par *S. aureus* de divers aliments prêts à consommer. En dernier lieu, les auteurs ont cité l'étude coréenne de **Kim et al. (2011)** [Kim, N.; Yun, A.-R.; Rhee, M. **Prevalence and classification of toxigenic Staphylococcus aureus isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. J. Appl. Microbiol. 2011, 111, 1456–1464**], portant sur des aliments prêts à consommer réfrigérés. Les auteurs ont été très précis dans cette partie de la discussion en citant des références de la même zone géographique (Asie : extrême orient) où les habitudes sont pratiquement les mêmes. De plus, toutes les études signalées par les auteurs confirment la présence de *S. aureus* dans les aliments prêts à consommer quelles que soient leurs origines, avec une prévalence variable. Enfin, les auteurs suggèrent que la prévalence de *S. aureus* dans les aliments prêts à consommer en vrac de la province chinoise du Sichuan était à un niveau relativement faible par rapport à celle d'autres régions ou types d'aliments, ce qui pourrait être lié à l'origine des matières premières, à la technologie de transformation et aux méthodes d'analyse. Cette contamination par *S. aureus* des aliments prêts à consommer reste tout de même préoccupante.

Tableau III : Prévalence de *Staphylococcus aureus* — Types multirésistants (MDR), ultrarésistants (XDR) et résistants à la méthicilline (SARM) dans 2160 aliments en vrac prêts à consommer incluant les produits carnés et laitiers, les fruits et légumes et les desserts.

Types d'aliments	Nb total d'échantillons	Détection de <i>S. aureus</i>				
		Nb (%) d'échantillons	Nb de <i>S. aureus</i>	Nb de MDR ^a	Nb de XDR ^b	Nb de SARM
Produits carnés	1209	24 (2.0)	31	10	0	1
Produits laitiers	200	4 (2.0)	6	6	0	0
Fruits et légumes	401	7 (1.8)	9	3	0	0
Desserts	350	7 (2.0)	8	2	0	2
Total	2160	42 (1.9)	54	21	0	3

^aMDR est définie comme une résistance acquise à au moins un agent appartenant à trois classes différentes ou plus.

^bXDR est définie comme une résistance à au moins un agent dans toutes, sauf à deux classes d'antibiotiques ou plus.

4.2. Résistance phénotypique et gènes associés des isolats de *Staphylococcus aureus*

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont montré que les 54 isolats de *S. aureus* étaient sensibles à la vancomycine, à la tigécycline, au linézolide et à la quinupristine/dalfopristine (**Tableau IV**). Sur 54 isolats, 49 (90.7%), 25 (46.3%), 22 (40.7%) et 12 (22.2%) étaient résistants à la pénicilline, l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline, respectivement. Dix (18.5%) avaient une résistance inductible à la clindamycine. Seulement quelques isolats étaient résistants à la ciprofloxacine (13.0%), la gentamicine (13.0%), le triméthoprim/sulfaméthoxazole (11.1%), la lévofloxacine (7.4%), la moxifloxacine (7.4%), la céfoxitine (5.6%), l'oxacilline (5.6%) et la rifampicine (1.9%).

Comme première analyse à cette tranche des résultats, les auteurs ont essayé d'interpréter la résistance observée parmi les isolats de *S. aureus*, en s'appuyant sur des données déjà publiées et qui donnent une explication qui est peut être connue: "les antibiotiques sont tout simplement de plus en plus utilisés pour le traitement des maladies bactériennes chez l'homme et l'animal". Plusieurs antibiotiques, notamment pour les β -lactames (pénicilline), les macrolides (érythromycine) et les lincosamides (clindamycine), sont généralement appliqués en médecine vétérinaire. Cependant, les auteurs expliquent le faible taux de résistance des isolats à l'oxacilline au fait que l'oxacilline n'est pas couramment utilisée dans les pesticides, les aliments pour animaux et les matières premières alimentaires. Cette constatation est très différente de la haute résistance à l'oxacilline (70.3%, 52/74) dans les échantillons cliniques, car l'oxacilline est le médicament indiqué pour le traitement des infections causées par *S. aureus*. Les auteurs ont étayé la discussion de cette partie des résultats, ils enchaînent pour citer des travaux sur le même aspect entre autres ceux de **Li et al. (2019)**, **Xing et al. (2014)** et **Zehra et al. (2019)**, tous ont signalé la présence dans les aliments (poulets crus et viandes) ou dans les préparations prêtes à consommer d'isolats de *S. aureus* exhibant des résistances à la pénicilline, l'érythromycine, la tétracycline ou encore à la clindamycine.

Cette étude a aussi définie le degré de résistance des isolats (**Tableau III**). Vingt-et-un isolats (38.9%) ont été identifiés comme MDR. Les isolats MDR étaient distribués dans les quatre types d'aliments. Il a été noté que tous les 6 isolats provenant des produits laitiers ont été déterminés comme MDR et 3 (5.6%) isolats ont été identifiés comme SARM, dont l'un a été isolé d'un produit carné et les deux autres provenaient des desserts. Aucun XDR n'a été détecté.

Les auteurs ont effectué une comparaison dans les quatre catégories de produits étudiés. Les isolats de *S. aureus* provenant de produits à base de viande montraient une résistance à 10 catégories (13 types) d'antibiotiques, et les isolats provenant de produits laitiers, de fruits et légumes et de desserts étaient résistants à 7 catégories (7 types), 7 catégories (9 types) et 6 catégories (7 types), respectivement. Ce résultat pourrait être corrélé à l'administration fréquente de la tylosine de la classe des macrolides à des animaux, entraînant le développement d'une résistance croisée aux macrolides, aux lincosamides et aux streptogramines. Cette argumentation a été donnée en se référant aux travaux de **Thumu et Halami, 2012**). Ces résultats peuvent être justifiés par rapport au nombre élevé d'échantillons de produits carnés testés ajoutent les auteurs.

Il a été constaté que la résistance à la pénicilline présentait des taux élevés dans les quatre produits. Les taux de résistance à l'érythromycine et à la clindamycine sont nettement plus élevés dans les produits carnés et les produits laitiers que dans les fruits, les légumes et les desserts. L'existence d'une résistance inducible à la clindamycine n'a été constatée que dans les produits carnés et laitiers. D'autres résistances aux antibiotiques ont été distribuées au hasard en raison de la faible performance de la résistance.

Les résistances à la pénicilline, l'érythromycine, la clindamycine, la tétracycline et la résistance inducible à la clindamycine ont été déterminées comme étant les prédominantes parmi les 54 isolats de *S. aureus* (**Tableau IV**). Les gènes de résistance impliqués à savoir: *blaZ*, *erm* (*ermA* et/ou *ermC*) et *tet* (*tetL*, *tetM* et/ou *tetK*) ont été mesurés. Au total, 54 (100%), 47 (87%) et 51 (94.4%) des 54 isolats étaient positifs pour les gènes *blaZ*, *erm* et *tet*, respectivement. Il convient de noter que les isolats ayant la résistance phénotypique de ces cinq antibiotiques ont tous été déterminés positifs pour le gène résistant associé (**Tableau V**). Enfin et après avoir cité les travaux de **Zelazny et al. (2005)** sur les gènes *ermA* et *ermC* qui pourraient coder pour la méthylase impliquée dans la modulation de résistance à la clindamycine et à l'érythromycine, les auteurs ont souligné l'importance de cette détermination moléculaire de la résistance aux antibiotiques dans l'évaluation de la résistance microbienne. Cependant, les isolats avec des gènes de résistance ne présentent pas toujours de résistance phénotypique indiquent les auteurs.

Tableau IV : Profils de résistance aux antibiotiques de *S. aureus*.

Source*	Profils de résistance aux antibiotiques**												
	P	E	CM	TE	ICR	CIP	GM	SXT	LEV	MXF	FOX	OX	RD
Produits carnés	27	14	11	8	7	4	2	2	3	3	1	1	1
Produits laitiers	6	6	6		3	2	3	2					
Fruits et légumes	8	3	3	1		1	1	2	1	1			
Desserts	8	2	2	3			1				2	2	
Total	49	25	22	12	10	7	7	6	4	4	3	3	1

*Les 54 isolats étaient tous sensibles à la vancomycine, à la tigécycline, au linézolide et à la quinupristine/dalfopristine et les données ne sont pas affichées.

**P, pénicilline; E, érythromycine; CM, clindamycine; TE, tétracycline; ICR, résistance inductible à la clindamycine; CIP, ciprofloxacine; GM, gentamicine; SXT, triméthoprim/sulfaméthoxazole; LEV, lévofloxacine; MXF, moxifloxacine; FOX, céfoxitine; OX, oxacilline; RD, rifampicine.

4.3. Capacité de formation de biofilm des isolats de *Staphylococcus aureus*

Trente-trois (61.1%) isolats de *S. aureus* parmi les 54 ont montré une capacité de formation de biofilm, y compris deux (3.7%) forts producteurs de biofilm, un (1.9%) modéré et 30 (55.6%) faibles (**Tableau V**). Il s'est avéré que la plupart des isolats (51/54) de cette étude ne possédaient pas ou ont une faible capacité de formation de biofilm, ce qui est cohérent avec le *S. aureus* isolé des aliments et est très différent de celui recueilli à partir d'échantillons cliniques. Les auteurs et pour discuter ces résultats ont essayé d'introduire des références (**Kroning et al., 2016; Bimanand et al., 2018**) sur des isolats de *S. aureus* d'origine alimentaire et clinique et leur capacité à former des biofilms. En comparant les isolats dans chaque catégorie de produit (**Tableau VI**), il a été remarqué que seulement deux isolats des produits carnés présentaient une forte production de biofilm. Pour le reste, 6 isolats provenant des produits laitiers avaient tous une faible capacité de formation de biofilm, tandis que ceux des fruits et légumes et de desserts présentaient une capacité faible ou nulle. Pour justifier la fréquence relative à la capacité de production de biofilm parmi les isolats des produits laitiers, même si elle a été caractérisée de faible, les auteurs ont cité les travaux de **Aslantas et Demir (2016)** qui rapportent que *S. aureus* avec une capacité de

formation de biofilm pouvait être détecté chez les vaches, en particulier dans les cas de mammite bovine.

Les catégories de résistance aux antibiotiques et la capacité de formation de biofilm des 54 *S. aureus* isolés à partir des aliments en vrac prêts à consommer sont illustrées dans la **figure 1**. Cette figure est explicite et indique que deux isolats de *S. aureus* avec une forte capacité de formation de biofilm ont montré une multi-résistance aux antibiotiques, et un producteur modéré de biofilm était résistant à deux catégories d'antibiotiques. Les faibles producteurs de biofilm ou pas du tout ont montré des plages de résistance aux antibiotiques différentes, d'une à trois catégories ou plus, à l'exception de deux isolats.

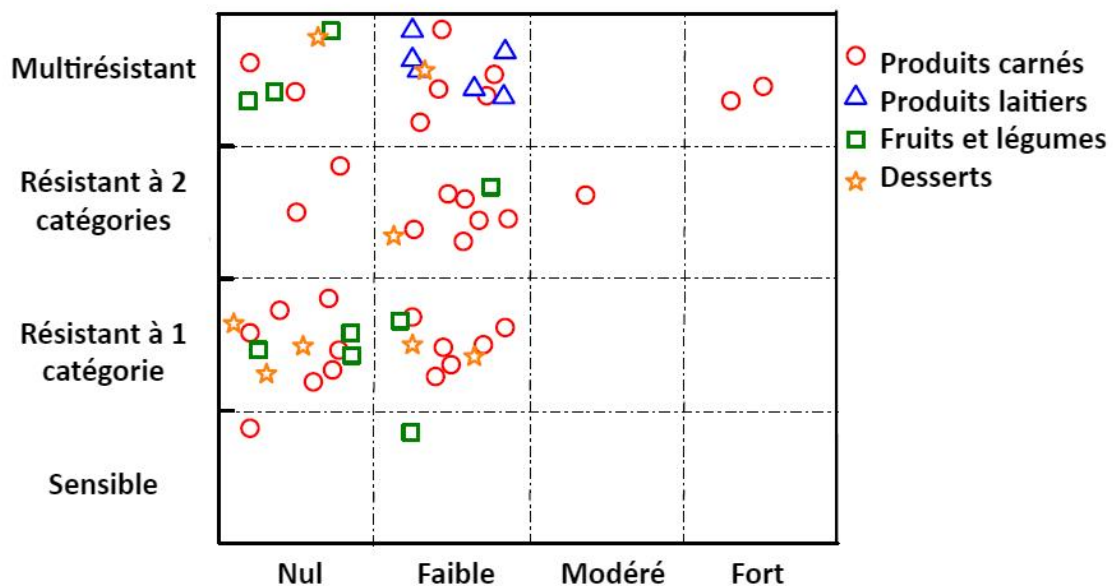


Figure 1 : Résistance aux antibiotiques et capacité de formation de biofilm. Pas de biofilm lorsque $OD/ODc \leq 1$, faible lorsque $1 < OD/ODc \leq 2$, modéré lorsque $2 < OD/ODc \leq 4$, et fort lorsque $4 < OD/ODc$.

Tableau V: Résistance phénotypique (P) et gènes associés (G), ainsi que la capacité de formation de biofilm des 54 isolats de *S. aureus*.

	Pénicilline		Erythromycine		Clindamycine		Tétracycline		Clindamycine (inductible)		Biofilm**
	P	G (<i>blaZ</i>)	P	G (<i>erm</i>)*	P	G (<i>erm</i>)*	P	G (<i>tet</i>)*	P	G (<i>erm</i>)*	
Produits carnés											
MT01	R****	+	R	+	R	+	R	+	R	+	Nul
MT02	R	+	R	+	R	+		+	R	+	Fort
MT03	R	+	R	+	R	+		+	R	+	Fort
MT04	R	+	R	+	R	+		+		+	Faible
MT05	R	+	R	+	R	+	R	+	R	+	Faible
MT06	R	+	R	+	R	+		+	R	+	Nul
MT07	R	+	R	+	R	+		+	R	+	Faible
MT08	R	+	R	+	R	+		+	R	+	Faible
MT09	R	+	R	+	R	+		+		+	Nul
MT10		+	R	+	R	+		+	R	+	Faible
MT11	R	+	R	+		+	R	+		+	Faible
MT12	R	+		+		+				+	Nul
MT13		+	R	+	R	+		+		+	Nul
MT14	R	+		+		+	R	+		+	Modéré
MT15	R	+		+		+	R	+		+	Faible
MT16	R	+		+		+	R	+		+	Faible
MT17	R	+					R	+			Faible
MT18	R	+	R	+		+	R	+		+	Faible
MT19	R	+	R	+		+		+		+	Faible
MT20		+		+		+	R	+		+	Faible
MT21	R	+		+		+		+		+	Faible
MT22	R	+		+		+		+		+	Nul
MT23	R	+		+		+		+		+	Faible
MT24	R	+		+		+		+		+	Nul
MT25	R	+		+		+		+		+	Faible
MT26	R	+		+		+		+		+	Nul
MT27	R	+						+			Nul
MT28	R	+						+			Faible
MT29	R	+						+			Faible
MT30	R	+									Nul
MT31	R	+		+		+		+		+	Nul
Produits laitiers											
DY01	R	+	R	+	R	+		+		+	Faible
DY02	R	+	R	+	R	+		+		+	Faible
DY03	R	+	R	+	R	+		+		+	Faible
DY04	R	+	R	+	R	+		+	R	+	Faible
DY05	R	+	R	+	R	+		+	R	+	Faible
DY06	R	+	R	+	R	+		+	R	+	Faible
Fruits et légumes											
FV01	R	+	R	+	R	+		+		+	Nul
FV02	R	+	R	+	R	+		+		+	Nul
FV03	R	+	R	+	R	+		+		+	Nul
FV04	R	+		+		+		+		+	Nul
FV05	R	+		+		+	R	+		+	Faible
FV06	R	+		+		+		+		+	Faible
FV07	R	+		+		+		+		+	Nul
FV08	R	+									Nul
FV09		+		+				+		+	Faible
Desserts											
CY01	R	+	R	+	R	+	R	+		+	Faible
CY02	R	+	R	+	R	+	R	+		+	Nul
CY03	R	+		+		+	R	+		+	Nul
CY04	R	+		+		+		+		+	Faible
CY05	R	+						+			Faible
CY06	R	+		+		+		+		+	Faible
CY07	R	+		+		+		+		+	Nul
CY08	R	+		+		+		+		+	Nul

* Les gènes *erm* incluent *ermA* et/ou *ermC*; les gènes *tet* incluent *tetL*, *tetM* et/ou *tetK*.

** Nul OD/ODc ≤ 1, faible 1 < OD/ODc ≤ 2, modéré 2 < OD/ODc ≤ 4, fort 4 < OD/ODc.

*** R: résistance, +: détecté.

5. Conclusion

Les auteurs ont fait un récapitulatif, en donnant l'essentiel des résultats observés sur les 54 isolats de *S. aureus* récupérés à partir de 2160 échantillons, notamment sur leur présence dans les produits carnés, les produits laitiers, les fruits et légumes et les desserts qui était de 31/1209 (2.6%), 6/200 (3.0%), 9/401 (2.2%) et 8/350 (2.3%), respectivement. La plupart des souches (52/54) étaient résistantes à au moins un des antibiotiques testés, 21 (38.9%) et 3 (5.6%) isolats ont été identifiés respectivement comme MDR et SARM. Ces résultats suggèrent que la contamination et la résistance aux antibiotiques de *S. aureus* dans les aliments en vrac prêts à consommer de la province chinoise du Sichuan devraient être plus préoccupantes. Les isolats de *S. aureus* avec une résistance phénotypique contre les cinq antibiotiques prédominants: pénicilline, érythromycine, clindamycine, tétracycline et la résistance inductible à la clindamycine ont tous été déterminés positifs pour le gène de résistance associé, et le ciblage du gène de résistance peut donc être utilisé comme référence importante pour l'évaluation de la résistance microbienne. La production de biofilm a été observée chez 33 (61.1%) isolats de *S. aureus*.

6. Références Bibliographiques

Les auteurs ont utilisé des références bien ciblées et d'actualité.

Article 2: Antibiotic Susceptibility of Different Lactic Acid Bacteria Strains. Karapetkov N., Georgieva R., Rumyan N. & Karaivanova E., 2011. *Beneficial Microbes*, 2(4): 335-339.

Article disponible sur:

<https://www.wageningenacademic.com/doi/epdf/10.3920/BM2011.0016>.

Description de l'étude

- Cette étude qui porte la résistance aux antibiotiques de différentes souches bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers ou fruits a été réalisée par Karapetkov et ses collaborateurs de l'entreprise biotechnologique « Lactina » de Bankya (Bulgarie). Elle a été publiée en 2011 dans *Beneficial Microbes*.

Justification du choix de l'article

- Cet article a été choisi pour être présenté pour deux principales raisons: son rapprochement avec le thème de notre mémoire et son protocole expérimental simple.

1. Résumé

Les auteurs ont cité les espèces de bactéries lactiques concernées par l'étude de la résistance à 27 antibiotiques ainsi que la méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice. Une forte sensibilité a été détectée pour la plupart des inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire (pénicillines, céfoxitine et vancomycine) et une résistance aux inhibiteurs de la synthèse de l'ADN (triméthoprime/sulfamides et fluoroquinolones). D'une manière générale, les souches de *Lactobacillus* étaient inhibées par des antibiotiques tels que le chloramphénicol, l'érythromycine et la tétracycline à des niveaux critiques inférieurs ou égaux aux niveaux définis par l'EFSA. Malgré le profil très similaire de *S. thermophilus* LC201 aux lactobacilles, la détection de la résistance à l'érythromycine nécessite la réalisation de tests supplémentaires afin de prouver l'absence de gènes de résistance transférables.

2. Introduction et objectifs

Dans la partie introduction, les auteurs ont fait un rappel bibliographique sur la définition de la résistance aux antibiotiques, la menace qu'elle représente pour la santé humaine et animale ainsi que sa cause majeure. Cette résistance peut être inhérente à une espèce ou un genre bactérien (intrinsèque) ou acquise par mutation ou par gain de gènes. Ils ont expliqué

que dans le cas des bactéries lactiques et en raison de leur applications en industrie alimentaire et pharmaceutique (comme probiotiques), leur résistance est un danger car elle est peut être transférée à des bactéries pathogènes. Bien qu'il n'existe aucune législation concernant les microorganismes ajoutés aux aliments fermentés et aux probiotiques à usage humain, à but préventif, il est recommandé que ces produits suivent des exigences similaires pour les additifs alimentaires (EFSA, 2007). Cette étude vise donc à obtenir des données relatives à la sensibilité phénotypique de quatre souches de *Lactobacillus* et d'une souche de *Streptococcus thermophilus* à une gamme pertinente d'antibiotiques en vue de leur applicabilité en tant que probiotiques.

3. Matériel et Méthodes

Le présent travail a suivi le protocole suivant: l'isolement des souches de bactéries lactiques, leur stockage et leur réactivation. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de chaque antibiotique ont été déterminées à l'aide d'un test de micro-dilution pour les populations bactériennes appartenant à la même espèce ou au même genre. La distinction entre les souches sensibles et les résistances acquises a été définie selon des seuils établis pour un groupe représentatif de dix antibiotiques selon le groupe scientifique sur les additifs et produits ou substances utilisés en alimentation animale (FEEDAP) et l'EFSA.

3.1. Souches de bactéries lactiques

Les souches *Lactobacillus acidophilus* LC10, *Lactobacillus helveticus* LC3, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LC1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* LC182 et *Streptococcus thermophilus* LC201 isolées à partir de produits laitiers ou de fruits font partie de la collection de laboratoire de « Lactina Ltd. » ont été sélectionnés pour la présente étude. Pour un entretien à long terme, les isolats ont été stockés à -65°C dans du bouillon MRS ou M17 à 20% (V/V) de glycérol. Avant l'analyse, les souches ont été cultivées à 37°C sur des géloses MRS ou M17 (Merck, Darmstadt, Germany) à partir desquelles des cultures jeunes ont été préparées pour l'inoculation du bouillon final utilisé pour les tests de susceptibilité aux antimicrobiens.

3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Les CMI de 27 antibiotiques des ont été déterminées à l'aide de tests de micro-dilution sur bouillon en utilisant les systèmes Sensititre® GPALL1F et EUST Staphylococci (Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, Royaume-Uni). Les antibiotiques utilisés sont indiqués dans le **tableau I**. Les tests ont été réalisés en suivant les instructions du fabricant. Les colonies provenant des milieux solides ont été prélevées, mises en suspension et ajustées à 0,5 McFarland dans de l'eau stérile. Des aliquotes de 10 ml de cette suspension ont été transférées dans 11 µl de milieu destiné au test de sensibilité. Un bouillon LSM (LAB susceptibility medium) normalisé composé d'un mélange de bouillon iso-sensible (IST) à 90% P/V (Oxoid, Basingstoke, Royaume-Uni), de bouillon MRS à 10% (P/V) ajusté à pH 6,7 et un bouillon SSM composé de bouillon IST (90%) et de bouillon M17 (10%) additionné de lactose à 0,5% (P/V) ont été utilisés pour les souches de *Lactobacillus* et *S. thermophilus*, respectivement. Des microplaques contenant des antibiotiques séchés sous vide ont été inoculées avec 50 µl de suspension. La concentration bactérienne finale était de 1×10^5 à 5×10^5 UFC/ml. Toutes les plaques ont été incubées à 37°C pendant 48h et les CMI ont été lues visuellement comme recommandé par CLSI. La concentration la plus faible d'antibiotique empêchant l'apparition de turbidité a été considérée comme la CMI. Comme contrôle positif, une souche *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 a été utilisée.

Tableau I : Les antibiotiques inclus dans le Sensititre® GPALL1F et EUST et leurs intervalles de dilutions utilisées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice.

Antibiotique	Type	Intervalle de dilution (µg/ml)	
		EUST	GPALL1F
Inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire			
Pénicilline	Pénicilline	0,12-2	0,06-8
Ampicilline	Pénicilline	-	0,12-8
Oxacilline+2%NaCl	Pénicilline	-	0,25-4
Céfoxitine	Céphalosporine	4-16	6
Vancomycine	Glycopeptide	1-16	0,25-32
Inhibiteurs de la synthèse protéique			
Chloramphénicol	Phénicol	4-64	2-16
Gentamycine	Aminoglycoside	1-16	2-16
Streptomycine	Aminoglycoside	4-32	1000
Kanamycine	Aminoglycoside	4-64	-
Quinupristine/dalfopristine	Streptogramines	1-4	0,5-4
Rifampicine	Rifamycine	0,016-0,5	0,5-4
Tétracycline	Tétracycline	0,5-16	2-16
Erythromycine	Macrolide	0,25-8	0,25-4
Tigécycline	Glycylcycline	-	0,03-0,5
Clindamycine	Lincosamide	0,12-4	0,5-2
Tiamuline	Pleuromutiline	0,5-4	-
Linézolide	Oxazolidinone	1-8	1-8
Acide fusidique	Fusidane	0,5-4	-
Mupirocine	Acide monocarboxylique	0,5-256	-
Inhibiteurs de la synthèse de l'ADN			
Triméthoprim/sulfaméthoxazole	Triméthoprim/sulfonamide	-	0,5/9,5-4/76
Triméthoprim	Triméthoprim	2-32	-
Sulfaméthoxazole	Sulfonamide	65-512	-
Lévofloxacine	Fluoroquinolone	-	0,25-4
Moxifloxacine	Fluoroquinolone	-	0,25-4
Ciprofloxacine	Fluoroquinolone	0,25-5	1-2
Nitrofurantoïne	Nitrofurane	-	32-64
Inhibiteur de la fonction de la membrane cellulaire			
Daptomycine	Lipopeptide	-	0,5-4

4. Résultats et Discussion

Les résultats sont bien détaillés puisque ils ont été décrits dans le texte et présentés aussi sous forme d'un tableau récapitulatif. La discussion s'est faite au fur et à mesure.

Dans la présente étude, cinq souches de bactéries lactiques ont été testées pour leur sensibilité à 27 antibiotiques. Les analyses ont été réalisées à l'aide de deux tests de sensibilité aux antibiotiques. Ces derniers représentent une micro-version de la méthode classique de dilution en bouillon et peuvent fournir des résultats qualitatifs (sensibles ou résistants) et quantitatifs (CMI) dans un format de plaque séchée. Les deux tests couvraient la liste complète des dix antibiotiques que l'EFSA a définis comme exigence de base pour le groupe des bactéries lactiques. Les seuils de référence sont présentés dans le **tableau II**. Un microorganisme est défini comme sensible quand il est inhibé par un antibiotique au niveau du seuil critique spécifique. Lorsque la CMI est supérieure à ce seuil, il est considéré comme résistant. En général, une bonne corrélation a été observée entre les deux tests. Les souches définies comme sensibles ou résistantes par les plaques EUST ont été définies comme telles par les plaques GPALL1F. De plus, les différents intervalles de concentrations de certains antibiotiques permettent une détermination plus précise des CMI. Pour certaines souches, des CMI différentes pour des antibiotiques spécifiques ont été observées entre les deux tests. Les souches de *Lactobacillus* et *S. thermophilus* testées n'ont pas montré de différences significatives dans leur profil de résistance aux antibiotiques. Une sensibilité élevée a été détectée pour la plupart des inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire. La plupart des souches présentaient des CMI pour les antibiotiques β -lactamines à l'extrémité inférieure des intervalles de concentration. *L. acidophilus* LC10 et *L. helveticus* LC3 n'ont résisté qu'à de faibles concentrations de céfoxitine (CMI = 8 μ g/ml).

Ruoff et al. (1988) ont rapporté que certaines souches de *Lactobacillus* sont intrinsèquement résistantes à la vancomycine. En revanche, dans cette étude, les auteurs ont constaté que toutes les souches étaient inhibées aux valeurs critiques proposées par le FEEDAP pour cet antibiotique et qu'elles étaient donc caractérisées comme sensibles. En général, les lactobacilles sont sensibles aux inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire, tels que les pénicillines, mais plus résistants aux céphalosporines (**Ammor et al., 2007**). Une sensibilité généralisée envers les pénicillines a déjà été observée dans les souches de *Lactobacillus* utilisées comme probiotiques ou cultures « starter » (**Danielsen and Wind, 2003; Klare et al., 2007; Belletti et al., 2009**). Aucune résistance à l'ampicilline et à la

pénicilline n'a été trouvée parmi les souches de *S. thermophilus* ou de *Lactobacillus* utilisées dans la production de yaourt (Hummel *et al.*, 2007). Les espèces du groupe *L. acidophilus* et *L. delbrueckii* ont été caractérisées comme relativement plus sensibles aux pénicillines et à la vancomycine par rapport aux autres espèces de bactéries lactiques (Klare *et al.*, 2007). Cependant, un niveau élevé de résistance intrinsèque aux glycopeptides a été observé chez certains lactobacilles probiotiques tels que *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus plantarum* (Flòrez *et al.*, 2005; Klare *et al.*, 2007).

Les CMI des antibiotiques affectant la synthèse des protéines ont montré la plus grande variation de la dépendance à l'antimicrobien utilisé. Les souches de *Lactobacillus* testées ont été caractérisées comme sensibles au chloramphénicol, à la streptomycine, à la tétracycline, à l'érythromycine, à la quinupristine/dalfopristine et à la clindamycine, et résistantes à au moins un des antibiotiques aminosides. Trois des souches ont montré une croissance en présence d'une concentration élevée de kanamycine. La gentamicine était moins active contre *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LC182 et *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LC1 avec une CMI \geq 16 μ g/ml par rapport à 4 μ g/ml pour *L. acidophilus* LC10 et *L. helveticus* LC3. Seul *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LC182 était résistant à la streptomycine.

La résistance élevée des lactobacilles à la kanamycine rapportée par Zhou *et al.* (2005) a été confirmée dans cette étude pour *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* et *L. helveticus*. Cependant, aucune résistance à la tétracycline et à l'érythromycine n'a pu être observée contrairement aux résultats de Temmerman *et al.* (2003). Les résultats de la présente étude sont essentiellement conformes aux résultats précédemment rapportés de Belletti *et al.* (2009), où la plupart des *L. helveticus* et *L. delbrueckii* subsp. *lactis* étaient sensibles à la tétracycline, l'érythromycine et la clindamycine et résistantes à la gentamicine. Les lactobacilles seraient généralement résistants aux aminosides (gentamicine, kanamycine et streptomycine) et sensibles à d'autres inhibiteurs de la synthèse des protéines. La résistance intrinsèque aux aminosides est attribuée à l'absence de transport d'électrons médié par le cytochrome, permettant l'absorption des antibiotiques. Cependant, il existe certaines divergences dans les résultats obtenus dans cette étude concernant la sensibilité des lactobacilles aux aminosides et les données précédemment rapportées par d'autres auteurs. *L. delbrueckii* subsp. *lactis* et *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ont donné les résultats attendus en termes de résistance à la gentamicine et *L. delbrueckii* subsp. *lactis* à la streptomycine,

tandis que pour le reste des souches de lactobacilles, les aminosides étaient des inhibiteurs efficaces à des niveaux inférieurs à ceux fixés par le FEEDAP, les qualifiant de sensibles.

S. thermophilus LC201 a montré une résistance à la kanamycine, à la streptomycine et à l'érythromycine et une sensibilité envers le reste des inhibiteurs de la synthèse des protéines. L'incidence de la résistance à l'érythromycine et à la tétracycline entre les souches de *S. thermophilus* était généralement faible. Cependant, différentes souches de *S. thermophilus* ont été précédemment décrites comme ayant acquis des gènes de résistance, qui sont responsables de leur résistance à l'érythromycine, à la streptomycine et à la tétracycline. Bien que *S. thermophilus* ne soit pas pathogène, il pourrait transférer des gènes de résistance aux antibiotiques à des bactéries pathogènes et représente donc un risque clinique potentiel qui doit être soigneusement évalué. Dans cet aspect, *S. thermophilus* LC201 devrait être soumis à une analyse génétique supplémentaire afin de déterminer la nature de sa résistance aux antibiotiques, notamment à l'érythromycine, en étudiant la présence de gènes de résistance transférables.

Parmi les autres inhibiteurs de la synthèse protéique, l'antibiotique linézolide a montré une activité antibactérienne contre la plupart des bactéries lactiques testées avec une CMI comprise entre 2 et 4 µg/ml. De plus, tous les lactobacilles étaient résistants au fusidate (CMI>4 µg/ml) et donc les résultats rapportés par **Zhou et al. (2005)** pourrait être confirmés. Au sein du genre *Lactobacillus* et en fonction de l'espèce, une réaction très différente envers l'acide fusidique a été enregistrée (**Klare et al., 2007**). La plupart des souches testées ont montré un niveau élevé de résistance aux inhibiteurs de la synthèse de l'ADN. Les lactobacilles semblent être intrinsèquement résistants aux fluoroquinolones (e.g. ciprofloxacine et lévofloxacine), par un mécanisme de résistance inconnu. La résistance à d'autres inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques tels que le triméthoprime et les sulfamides a également été signalée comme une caractéristique intrinsèque.

Tableau II : Distribution des concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g/ml}$) aux antibiotiques pour les souches de bactéries lactiques en utilisant les plaques GPALL1F et EUST¹.

Antibiotique	<i>L. acidophilus</i> LC10		<i>L. lactis</i> LC182		<i>L. bulgaricus</i> LC1		<i>L. helveticus</i> LC3		<i>S. thermophilus</i> LC201	
	EFSA ²	Sensititre	EFSA	Sensititre	EFSA	Sensititre	EFSA	Sensititre	EFSA	Sensititre
Pénicilline		0,25		$\leq 0,06$		$\leq 0,06$		$\leq 0,06$		$\leq 0,06$
Ampicilline	1	$\leq 0,12$	1	$\leq 0,12$	1	$\leq 0,12$	1	$\leq 0,12$	2	$\leq 0,12$
Oxacilline+2%NaCl		$\leq 0,25$		$\leq 0,25$		$\leq 0,25$		$\leq 0,25$		$\leq 0,25$
Céfoxitine		8		$\leq 0,5$		1		8		6
Vancomycine	2	1	2	1	2	1	2	1	4	0,5
Chloramphénicol	4	4	4	4	4	4	4	≤ 2	4	4
Gentamycine	16	8	16	>16	16	>16	16	8	32	16
Streptomycine	16	≤ 4	16	32	16	≤ 4	16	≤ 4	64	>32
Kanamycine	16	32	16	64	16	8	16	64	64	>64
Quinupristine/dalfopristine	4	1	4	$\leq 0,5$	4	$\leq 0,5$	4	$\leq 0,5$	4	$\leq 0,5$
Rifampicine		4		0,12		0,06		>4		0,03
Tétracycline	4	2	4	$\leq 0,5$	4	$\leq 0,5$	4	1	4	$\leq 0,5$
Erythromycine	1	0,5	1	$\leq 0,25$	1	$\leq 0,25$	1	0,5	2	8
Tigécycline		0,12		0,12		0,12		$>0,5$		0,06
Clindamycine	1	1	1	$\leq 0,12$	1	$\leq 0,12$	1	1	2	0,25
Tiamuline		4		$\leq 0,5$		$\leq 0,5$		1		4
Linézolide		2		≤ 1		2		4		2
Acide fusidique		>4		>4		>4		>4		1
Mupirocine		1		$\leq 0,5$		$\leq 0,5$		2		$\leq 0,5$
Triméthoprim/sulfaméthoxazole		$>4/76$		$\leq 0,5/9,5$		$\leq 0,5/9,5$		2/38		4/76
Triméthoprim		>32		≤ 2		>32		>32		>32
Sulfaméthoxazole		>512		>512		>512		>512		>512
Lévofoxacine		>4		>4		>4		>4		4
Moxifloxacine		>4		4		4		>4		4
Ciprofloxacine		>8		>8		>8		>8		4
Nitrofurantoïne		≤ 32		≤ 32		≤ 32		≤ 32		≤ 32
Daptomycine		>4		>4		>4		>4		>4

¹Lorsque les résultats de deux dosages diffèrent, la valeur de la concentration inhibitrice minimale supérieure est indiquée.

²Les souches dont les concentrations minimales inhibitrices sont supérieures aux valeurs critiques sont considérées comme résistantes (EFSA, 2008).

5. Conclusion

Pour conclure cet article, la distinction entre des souches bactériennes résistantes ou sensibles a été rendue possible grâce à la méthode de micro-dilution. Cette étude confirme l'hypothèse que la détermination des CMI pour une gamme pertinente d'antimicrobiens est un moyen fiable de prédire le comportement envers les antibiotiques de différentes souches de bactéries lactiques en ce qui concerne leur utilisation comme cultures probiotiques. Toutes les souches de *Lactobacillus* testées étaient sensibles ou intrinsèquement résistantes à un ensemble recommandé d'antibiotiques. Les auteurs ont pu démontrer la présence d'une multi-résistance naturelle de *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, mais il est présumé présenter un potentiel minimal de transfert horizontal de la résistance. Étant donné que les gènes des lactobacilles conférant une résistance à des antibiotiques spécifiques ne sont probablement pas associés à des éléments génétiques mobiles, le risque de transfert vers d'autres organismes peut être considéré comme minime, ce qui les rend sûrs pour une utilisation dans différents produits probiotiques destinés à la consommation humaine ou animale. Le *S. thermophilus* a démontré une résistance plus élevée à des composés antimicrobiens spécifiques, en particulier à l'érythromycine, par conséquent, des tests génétiques supplémentaires sont nécessaires concernant cette souche afin d'éviter tout risque potentiel.

6. Références Bibliographiques

Références bien adaptées à la thématique de l'article.

-Comparaisons possibles-

L'étude de **Lin et ses collaborateurs datant de 2019** est plus récente que celle de **Karapetkov et ses collaborateurs qui date de 2011**. Les espèces bactériennes visées dans les deux études sont complètement différentes. *Staphylococcus aureus* étant un pathogène redoutable, sa présence potentielle dans un aliment est un danger direct pour le consommateur. Quant aux bactéries lactiques, les différentes souches mentionnées sont destinées à un usage bénéfique, mais leur résistance à tout antibiotique représente un risque de transfert vers des pathogènes. Les deux protocoles suivis sont cependant

relativement simples bien qu'ils n'ont pas de relation directe avec celui élaboré pour notre mémoire de fin d'étude. Enfin, la recherche de *Staphylococcus aureus* a été beaucoup plus qualitative contrairement aux bactéries lactiques dont la sensibilité et/ou la résistance aux différents antibiotiques testés a été mesurée et comparée à des seuils réglementaires.

Conclusion

Conclusion

Ce travail a permis de mettre en évidence la présence de germes antibio-résistants dans de différents produits laitiers analysés.

L'isolement combiné à l'antibiogramme a été effectué à partir d'un total de cinq (05) produits laitiers soit deux (02) échantillons de beurre industriel et traditionnel, trois (03) échantillons de fromages dont deux (02) de camembert et un (01) de fromage frais sur milieux MRS-agar et TSA sur lesquels ont été disposés les sept (07) antibiotiques à tester: acide fusidique, érythromycine, chloramphénicol, oxacilline, pénicilline, spiramycine et vancomycine. Après la lecture de l'antibiogramme, une trentaine de repiquages a été réalisée dans le but d'affiner la recherche et poursuivre l'étude jusqu'à l'identification des microorganismes en question. A l'issue du protocole élaboré et faute de temps, seuls quelques isolats ont été pré-caractérisés.

Des résultats partiels retenus, l'isolat I3 présélectionné résistant à la spiramycine a été considéré comme un genre faisant probablement partie des *Enterobacteriaceae*. Il a présenté, avec l'isolat I8, une forte production d'EPS et de gaz. Des coques en grappes ont été observés après l'état frais de l'isolat I25 résistant à la pénicilline, ce qui suggère des Staphylocoques, et des bâtonnets longs pour l'isolat I7 résistant à la vancomycine. Cependant, la confirmation partielle de l'antibio-résistance n'a concerné que les isolats I3, I7 et I8.

Il est important de noter que tous les aliments sélectionnés contenaient au moins un isolat étant résistant à au moins un antibiotique, si ce n'est la totalité des antibiotiques testés. Ainsi et malgré les limites imposées à notre travail pratique par la situation exceptionnelle de cette année, le thème que nous avons choisi relève un sujet important pour la sécurité et la santé publique. Nous regrettons de ne pas avoir pu poursuivre les étapes d'identification, car nous avons comme perspective majeure de démontrer les risques liés à la consommation de certains aliments qui semblent inoffensifs au premier abord et qui, selon certains facteurs en rapport avec l'environnement ou encore l'état du consommateur, peuvent avoir des répercussions assez graves.

Enfin, les articles présentés confirment réellement ce risque attribué à la présence dans la matrice de la majorité des produits alimentaires de germes bénéfiques (ex. bactéries lactiques) ou pathogènes (ex. *S. aureus*) antibio-résistants.

Références Bibliographiques

- **Akabanda F., Hlortsi E. H. & Owusu-Kwarteng J., 2017.** Food Safety Knowledge, Attitudes and Practices of Institutional Food-Handlers in Ghana. *BMC Public Health*, **17**(1): 40.
- **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.
- **Algburi A., Comito N., Kashtanov D., Dicks L. M. T. & Chikindas M. L., 2017.** Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, **83**(3): e02508-16.
- **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.
- **AL-Mamun M., Chowdhury T., Biswas B. & Absar N., 2018.** Food Poisoning and Intoxication: A Global Leading Concern for Human Health. *Food Safety and Preservation*, **11**: 307-352.
- **Alpas H., 2008.** Food Chain Security Pilot Study: Findings and Recommendations, In : Alpas H. and Çırakoğlu P., 2008 : Food Chain Security, Eds. Springer. Dordrecht (Netherlands), 2.
- **Anand S. K. and Griffiths M. W., 2011.** Pathogens in Milk | *Enterobacteriaceae*, In : Fuquay J. W., P. F. Fox & P. L. H. McSweeney, 2011 : Encyclopedia of Dairy Sciences 2nd Edition, Eds. Academic Press. California (United States), 67-71.
- **Anderl J.N., Franklin M. J. & Stewart P.S., 2000.** Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**(7): 1818-1824.
- **Anon., 1987.** Testing methods for use in quality assurance of culture media. *Journal of Food Microbiology*, **5**: 291-296.
- **Argemi X., Hansmann Y., Christmann D., Lefebvre S., Jaulhac B. & Jehl F., 2013.** In Vitro Activity of Daptomycin against Enterococcus Faecalis under Various Conditions of Growth-Phases, Inoculum and pH. *PLOS One*, **8**(5): e64218.
- **Badi S., Cremonesi P., Abbassi M. S., Ibrahim C., Snoussi M., Bignoli G., Luini M., Castiglioni B. & Hassen A., 2018.** Antibiotic Resistance Phenotypes and Virulence-Associated Genes in *Escherichia coli* Isolated from Animals and Animal Food Products in Tunisia. *FEMS Microbiology Letters*, **365**(10): 1-7.
- **Bardet L., Le Page S., Leangapichart T. & Rolain J.-M., 2017.** LBJMR Medium: A New Polyvalent Culture Medium for Isolating and Selecting Vancomycin and Colistin-Resistant Bacteria. *BMC Microbiology*, **17**(1): 220.
- **Baselga R., Albizu I. & Amorena B., 1994.** *Staphylococcus aureus* And Slime as Virulence Factors in Ruminant Mastitis. A Review. *Veterinary Microbiology*, **39**(3-4): 195-204.
- **Bassetti M. and Righi E., 2015.** Development of Novel Antibacterial Drugs to Combat Multiple Resistant Organisms. *Langenbeck's Archives of Surgery*, **400**(2): 153-165.
- **Batoni G., Maisetta G. & Esin S., 2016.** Antimicrobial Peptides and Their Interaction with Biofilms of Medically Relevant Bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1858**(5): 1044-1060.

- **Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C. and Turck M., 1966.** Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, **45**(4): 493-496.
- **Bengtsson-Palme J., Kristiansson E. & Larsson D. G. J., 2018.** Environmental Factors Influencing the Development and Spread of Antibiotic Resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, **42**(1): 68-80.
- **Benson H. J., 2001.** Microbiological Applications: A Laboratory Manual in General Microbiology 8th Edition, Eds. McGraw-Hill. New York (United States), 72-73.
- **Birkenhauer E. and Neethirajan S., 2015.** Prevention and Control of Biofilms in the Food Industry and Bio-Nanotechnology Approaches, In : Pometto A. L. III and Demirci A., 2015 : Biofilm in the Food Environment 2nd Edition, Eds. Wiley-Blackwell. Oxford (United Kingdom), 84-86.
- **Bleichner O. et Legrand-Hamon C., 2019.** Adaptation de la méthode HACCP à la prévention des risques en radiothérapie. *Cancer/Radiothérapie*, **23**(6-7): 520-522.
- **Bowler P. G., 2018.** Antibiotic Resistance and Biofilm Tolerance: A Combined Threat in the Treatment of Chronic Infections. *Journal of Wound Care*, **27**(5): 273-277.
- British Pharmacopoeia. 2nd Edition. (2000)
- **Brunet S., Delvenne P. and Claisse F., 2008.** Food Chain Security and Vulnerability, In : Alpas H. and Çirakoğlu P., 2008 : Food Chain Security, Eds. Springer. Dordrecht (Netherlands), 11.
- **Calvarese S., Forti A. F., Scortichini G. & Diletti G., 2006.** Chloramphenicol in Royal Jelly: Analytical Aspects and Occurrence in Italian Imports. *Apidologie*, **37**(6): 673-678.
- **Campedelli I., Mathur H., Salvetti E., Clarke S., Rea M. C., Torriani S., Ross R. P., Hill C. & O'Toole P. W., 2019.** Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, **85**(1): e01738-18.
- **Carniello V., Peterson B. W., van der Mei H. C. & Busscher H. J., 2018.** Physico-Chemistry from Initial Bacterial Adhesion to Surface-Programmed Biofilm Growth. *Advances in Colloid and Interface Science*, **261**: 1-14.
- **Chandra H., Bishnoi P., Yadav A., Patni B., Mishra A. P. & Nautiyal A. R., 2017.** Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials—A Review. *Plants*, **6**(2): 16.
- **Chmara H., Ripa S., Mignini F., Borowski E., 1991.** Bacteriolytic Effect of Teicoplanin. *Journal of General Microbiology*, **137**(4): 913-919.
- CLSI (2016) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—26th ed. M100S. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI (2018) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—13th ed. M02. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI (2018) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—12th ed. M02-A13. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- **Cloete E., Molobela I., Van Der Merwe A. & Richards M., 2009.** Biofilms in the Food and Beverage Industries: An Introduction, In : Fratamico P. M., Annous B. A. &

- Gunther N. W. IV, 2009 : Biofilms in the Food and Beverage Industries, Eds. Woodhead. Cambridge (United Kingdom), 3.
- **Cole M. L. and Singh O. V., 2017.** Foodborne Pathogens and Their Apparent Linkage with Antibiotic Resistance, In : Singh O. V., 2017 : Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance, Eds. Wiley-Blackwell. New Jersey (United States), 256-257.
 - **Costerton J. W. and Lappin-Scott H. M., 1995.** Introduction to Microbial Biofilms, In : Costerton J. W. and Lappin-Scott H. M., 1995 : Microbial Biofilms, Eds. Cambridge University Press. Cambridge (United Kingdom), 3-4.
 - **Davies J. and Davies D., 2010.** Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **74**(3): 417-433.
 - **Davison H. C., Woolhouse M. E. J., & Low J. C., 2000.** What Is Antibiotic Resistance and How Can We Measure It? *Trends in Microbiology*, **8**(12): 554-559.
 - **De Man J. C., Rogosa M. and Sharpe M. Elisabeth, 1960.** A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, **23**(1): 130-135.
 - **De Vrese M. and Schrezenmeir J., 2008.** Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **111**: 1-66.
 - **Del Pozo J. L. and Patel R., 2007.** The Challenge of Treating Biofilm-associated Bacterial Infections. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **82**(2): 204-9.
 - **Delarras C., 2007.** Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyses ou contrôle sanitaire. Eds : Tec&Doc-Médicales Internationales. Paris (France). 476p.
 - **Delarras C., 2014.** Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures-moisissures, Eds. Tec&Doc. Paris (France), 800p.
 - **Donlan R.M. and Costerton J.W., 2002.** Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**(2): 167-193.
 - **Doyle M. E., Hartmann F. A. & Lee Wong A. C, 2012.** Methicillin-Resistant Staphylococci: Implications for Our Food Supply? *Animal Health Research Reviews*, **13**(2): 157-180.
 - **Ermakova I. V., 2008.** New System of Food Control in Russia, In : Alpas H. and Çırakoğlu P., 2008 : Food Chain Security, Eds. Springer. Dordrecht (Netherlands), 79-80.
 - **Estrada-Flores S., 2010.** Understanding Innovation in Food Chains, In : Mena C. and Stevens G., 2010 : Delivering Performance in Food Supply Chains, Eds. Woodhead. Cambridge (United Kingdom), 100.
 - European Pharmacopoeia. 6th Edition (2008)
 - **Fernandes Dos Santos F., Mendonça L. C., Reis D. R. L., Guimarães A. S., Lange C. C., Ribeiro J. B., Machado M. A. & Brito M. A. V. P., 2016.** Presence of mecA-Positive Multidrug-Resistant *Staphylococcus epidermidis* in Bovine Milk Samples in Brazil. *Journal of Dairy Science*, **99**(2): 1374-1382.
 - **Flemming H.-C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S. A. & Kjelleberg S., 2016.** Biofilms: An Emergent Form of Bacterial Life. *Nature Reviews Microbiology*, **14**(9): 563-575.
 - **Florez-Cuadrado D., Moreno M. A., Ugarte-Ruíz M. & Domínguez L., 2018.** Antimicrobial Resistance in the Food Chain in the European Union. *Advances in Food and Nutrition Research*, **86**: 115-136.
 - **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.

- **Fung F., Wang H.-S. & Menon S., 2019.** Food Safety in the 21st Century. *Biomedical Journal*, **41**(2): 88-95.
- **Gabriel J. M. O., 2016.** An Empirical Examination of the Nexus between Information Systems and Organizational Performance Behaviors of Quick - Service Restaurants in Port Harcourt. *International Journal of Management & Information Systems*, **20**(3): 59-72.
- **Gallo G. and Puglia A. M., 2014.** Antibiotics and Resistance: A Fatal Attraction, In : Gualerzi C. O., Brandi L., Fabbretti A. and Pon C. L., 2014 : Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance, Eds. Wiley-VCH. Weinheim (Germany), 73.
- **Ge B., Jiang P., Han F., Saleh N. K., Dhiman N., Fedorko D. P., Nelson N. A. & Meng J., 2007.** Identification and Antimicrobial Susceptibility of Lactic Acid Bacteria from Retail Fermented Foods. *Journal of Food Protection*, **70**(11): 2606-2612.
- **Giaouris E., Chorianopoulos N., Doulgeraki A. & Nychas G.-J., 2013.** Co-Culture with *Listeria monocytogenes* within a Dual-Species Biofilm Community Strongly Increases Resistance of *Pseudomonas putida* to Benzalkonium Chloride. *PLOS One*, **8**(10): e77276.
- **Gibson G. R., McCartney A. L. & Rastall R. A., 2005.** Prebiotics and Resistance to Gastrointestinal Infections. *British Journal of Nutrition*, **93**(S1): S31-S34.
- **Giraffa G., 2003.** Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, **88**(2-3): 215-222.
- **Goldstein E. J. C., Tyrrell K. L. & Citron D. M., 2015.** *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, **60**(S2): S98-S107.
- **Goller C. C. and Romeo T., 2008.** Environmental Influences on Biofilm Development, In : Romeo T., 2008 : Bacterial Biofilms, Eds. Springer. Berlin (Germany), 37.
- **Gorny J., 2006.** Microbial Contamination of Fresh Fruits and Vegetables, In : Sapers G. M., Gorny J. R. & Yousef A. E., 2006 : Microbiology of Fruits and Vegetables, Eds. CRC Press. Florida (United States), 4.
- **Gorris L. G. M., 2005.** Food Safety Objective: An Integral Part of Food Chain Management. *Food Control*, **16**(9): 801-809.
- **Grandin T., 2019.** Principles for Commercial Supply Chain Managers of Livestock and Poultry, In : Galanakis C. M., 2019 : Sustainable Meat Production and Processing, Eds. Academic Press. London (United Kingdom), 8.
- **Gray K. M., Passador L., Iglewski B. H. & Greenberg E. P., 1994.** Interchangeability and Specificity of Components from the Quorum-Sensing Regulatory Systems of *Vibrio Fischeri* and *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **176**(10): 3076-3080.
- **Guarascio A. J., Brickett L. M., Porter T. J., Lee N. D., Gorse E. E. & Covey J. R., 2019.** Development of a Statewide Antibigram to Assess Regional Trends in Antibiotic-Resistant ESKAPE Organisms. *Journal of Pharmacy Practice*, **32**(1): 19-27.
- **Guiraud J.-P., 1998.** Microbiologie alimentaire, Eds. Dunod. Paris (France), 80-291.
- **Gutiérrez D., Rodríguez-Rubio L., Martínez B., Rodríguez A. & García P., 2016.** Bacteriophages as Weapons against Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Frontiers in Microbiology*, **7**: 825.

- **Hall-Stoodley L., Costerton J.W. & Stoodley P., 2004.** Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases. *Nature Reviews Microbiology*, **2**(2): 95-108.
- **Hambræus L. and Lönnerdal B., 2003.** Nutritional Aspects of Milk Proteins, In : Fox P. F. and McSweeney P. L. H. 2003 : *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1: Proteins, Parts A&B 3rd Edition*, Eds. Springer. New York (United States), 605.
- **Havelaar A. H., Brul S., de Jong A., de Jonge R., Zwietering M. H. & ter Kuile B. H., 2010.** Future Challenges to Microbial Food Safety. *International Journal of Food Microbiology*, **139**(S1): S79-S94.
- **Hoelzer K., Wong N., Thomas, J., Talkington K., Jungman E. and Coukell A., 2017.** Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? *BMC Veterinary Research*, **13**: 1.
- **Hsieh L. and Amin. A, 2016.** Antimicrobial Stewardship: Hospital Strategies to Curb Antibiotic Resistance, In : Kon K. and Rai M., 2016 : *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches*, Eds. Academic Press. London (United Kingdom), 1.
- **Hu X., Chen F., Wang P. & Chen Z., 2017.** The Importance of Food Safety for Fruits and Vegetables, In : Jen J. J. and Chen J., 2014 : *Food Safety in China: Science, Technology, Management and Regulation*, Eds. Wiley. New Jersey (United States), 489-501.
- ICMSF (2002) *Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- ICMSF (2006) *A Simplified Guide to Understanding and Using Food Safety Objectives and Performance Objectives*.
- IDF (1981) Joint IDF/ISO/AOAC Group E44.
- **Ivanova K., Fernandes M. M. & Tzanov T., 2013.** Current Advances on Bacterial Pathogenesis Inhibition and Treatment Strategies, In : Méndez-Vilas A., 2013 : *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, Eds. Formatex. Badajoz (Spain), 325.
- **Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M. A., Hussain T., Ali M., Rafiq M., Kamil M. A., 2017.** Bacterial Biofilm and Associated Infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, **81**(1): 7-11.
- Japanese Pharmacopoeia. 15th Edition. (2006)
- **Jehl F., Chabaud A., Grillon A., 2015.** L'antibiogramme : diamètres ou CMI ? *Journal des Anti-infectieux*, **133**: 1-3.
- **Jiang X. and Pace J. L., 2006.** Microbial Biofilms, In : Pace J. L., Rupp M. E. & Finch R. G., 2006 : *Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy*, Eds. CRC Press. Florida (United States), 4.
- **Jouenne T., 2008.** Biofilms bactériens. *Procédés chimie - bio - agro | Bioprocédés*, **600** : 1-8.
- **Kaplan J. B., 2010.** Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research*, **89**(3): 205-218.
- **Khan W., Bernier S. P., Kuchma S. L., Hammond J. H., Hasan F. & O'Toole G. A., 2010.** Aminoglycoside Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Modulated By Extracellular Polysaccharide. *International Microbiology*, **13**(4): 207-212.

- **Khazandi M., Al-Farha A. A., Coombs G. W., O'Dea M., Pang S., Trott D. J., Aviles R. R., Hemmatzadeh F., Venter H., Ogunniyi A. D., Hoare A., Abraham S. & Petrovski K. R., 2018.** Genomic Characterization of Coagulase-Negative Staphylococci Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus sciuri* Causing Bovine Mastitis. *Veterinary Microbiology*, **219**: 17-22.
- **Kolár M., Látal T., Kurasová Y. & Hájek V., 1996.** Comparison of the Results of Antibiotics Sensitivity Tests Using the Standard Microdilution Method on Isolated Bacteria and the Direct Disc Method on Positive Hemocultures From the Automatic BacT/Alert System. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, **45**(1): 30-34.
- **Lawrie R. A., 1983.** Aspects of the Biochemistry of Meat. *The International Journal of Biochemistry*, **15**(3): 233-242.
- **Lehotay S. J., 2018.** Food Safety Analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **410**(22): 5329-5330.
- **Li X.-Z., Plésiat P. & Nikaido H., 2015.** The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, **28**(2): 337-418.
- **Liu C., Zhang Z-Y., Dong K., Yuan J-P. & Guo X-K., 2009.** Antibiotic Resistance of Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated From Marketed Foods and Drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*, **22**(5): 401-412.
- **Lorenzo D., 2019.** Chloramphenicol Resurrected: A Journey from Antibiotic Resistance in Eye Infections to Biofilm and Ocular Microbiota. *Microorganisms*, **7**(9): 278.
- **Lozano G. E., Beatriz S. R., Cervantes F. M., María G. N. P. & Francisco J. M. C., 2018.** Low Accuracy of the Mcfarland Method for Estimation of Bacterial Populations. *African Journal of Microbiology Research*, **12**(31): 736-740.
- **Luber P., 2009.** Cross-Contamination versus Undercooking of Poultry Meat or Eggs — Which Risks Need To Be Managed First? *International Journal of Food Microbiology*, **134**(1-2), 21-28.
- **Marino M., Frigo F., Bartolomeoli I. & Maifreni M., 2010.** Safety-Related Properties Of Staphylococci Isolated From Food And Food Environments. *Journal of Applied Microbiology*, **110**(2): 550-561.
- **Markland S. M., Ingram D., Kniel K. E. & Sharma M., 2017.** Water for Agriculture: The Convergence of Sustainability and Safety. *Microbiology Spectrum*, **5**(3): 143-157.
- **Markowiak P. and Śliżewska K., 2017.** Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, **9**(9): 1021.
- **Martin J. F. and Demain A. L., 1980.** Control of Antibiotic Biosynthesis. *Microbiological Reviews*, **44**(2): 230-251.
- **Martins M. L., Pinto U. M., Riedel K. & Vanetti M. C. D., 2018.** Quorum Sensing and Spoilage Potential of Psychrotrophic *Enterobacteriaceae* Isolated from Milk. *BioMed Research International*, 1-13.
- **McClure P., 2011.** Hazard Analysis and Critical Control Point and Hygiene Considerations for the Fresh-Cut Produce Industry, In : Martín-Belloso O. and Soliva-Fortuny R., 2011 : Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing, Eds. CRC Press. Florida (United States), 320.
- **McEwen S. A. and Fedorka-Cray P. J., 2002.** Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clinical Infectious Diseases*, **34**(S3): S93-S106.

- **McLandsborough L. A., 2015.** Current Knowledge and Perspectives on Biofilm Formation and Remediation, In : Pometto A. L. III and Demirci A., 2015 : Biofilm in the Food Environment 2nd Edition, Eds. Wiley-Blackwell. Oxford (United Kingdom), 1-2.
- **Meek R. W., Vyas H. & Piddock L. J. V., 2015.** Nonmedical Uses of Antibiotics: Time to Restrict Their Use? *PLOS Biology*, **13**(10): e1002266.
- **Meshref A. M. S., 2010.** Microbiological Quality and Safety of Cooking Butter in Beni-Suef governorate-Egypt. *African Health Sciences*, **10**(2): 193-198.
- **Montville T. J., Matthews K. R. & Kniel K. E., 2012.** Detection and Enumeration of Microbes in Food, In : Montville T. J., Matthews K. R. & Kniel K. E., 2012 : Food Microbiology: An Introduction 3rd Edition, Eds. ASM Press. Washington DC (United States), 64.
- **Morehead M. S. and Scarbrough C., 2018.** Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, **45**(3): 467-484.
- **Mozaffarian D. and Wu J. H. Y., 2018.** Flavonoids, Dairy Foods, and Cardiovascular and Metabolic Health: A Review of Emerging Biologic Pathways. *Circulation Research*, **122**(2): 369-384.
- **Mueller J.H. and Hinton J., 1941.** Protein-Free Medium for Primary Isolation of *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **48**: 330-333.
- **Muhsin J., Ufaq T., Tahir H. & Saadia A., 2015.** Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **4**(3): 1-14.
- **Mukerji S., O'Dea M., Barton M., Kirkwood R., Lee T. & Abraham S., 2017.** Development and Transmission of Antimicrobial Resistance among Gram-Negative Bacteria in Animals and Their Public Health Impact. *Essays in Biochemistry*, **61**(1): 23-35.
- **Mulani M. S., Kamble E. E., Kumkar S. N., Tawre M. S. & Pardesi K. R., 2019.** Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology*, **10**: 539.
- **Nesme J. and Simonet P., 2015.** The Soil Resistome: A Critical Review on Antibiotic Resistance Origins, Ecology and Dissemination Potential in Telluric Bacteria. *Environmental Microbiology*, **17**(4): 913-930.
- **O'Mahony M., Fanning S. & Whyte P., 2009.** The Safety of Raw Liquid Milk, In : Tamime A. Y., 2009 : Milk Processing and Quality Management, Eds. Wiley-Blackwell. Oxford (United Kingdom), 156.
- **O'Toole G., Kaplan H. B., & Kolter R., 2000.** Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology*, **54**(1): 49-79.
- **Obaidat M. M., Bani Salman A. E. & Roess A. E., 2018.** High Prevalence and Antimicrobial Resistance of *mecA* Staphylococcus Aureus in Dairy Cattle, Sheep, and Goat Bulk Tank Milk in Jordan. *Tropical Animal Health and Production*, **50**(2): 405-412.
- **Okada M., Sato I., Jeong Cho S., Iwata H., Nishio T., Dubnau D & Sakagami Y., 2005.** Structure of the *Bacillus subtilis* Quorum-Sensing Peptide Pheromone ComX. *Nature Chemical Biology*, **1**(1): 23-24.
- **Oliveira M., Abadias M., Usall J., Torres R., Teixidó N. & Viñas I., 2015.** Application of Modified Atmosphere Packaging As a Safety Approach to Fresh-Cut Fruits and Vegetables: A Review. *Trends in Food Science and Technology*, **46**(1): 13-26.

- **Oliver S. P., Jayaro B. M. & Almeida R. A., 2005.** Foodborne Pathogens, Mastitis, Milk Quality, and Dairy Food Safety. *NMC Annual Meeting Proceedings*, **1**: 3-27.
- **Olsen A. M. and Scott W. J., 1946.** Influence of Starch in Media Used for the Detection of Heated Bacterial Spores. *Nature*. **157**: 337.
- **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.
- **Park J-M., Shin J-H., Bak D-J., Kim N-K., Lim K-S., Yang C-Y.3 & Kim J-M., 2014.** Determination of Shelf Life for Butter and Cheese Products in Actual and Accelerated Conditions. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, **34**(2): 245-251.
- **Petrova O. E. and Sauer K., 2016.** Escaping the Biofilm in More than One Way: Desorption, Detachment Or Dispersion. *Current Opinion in Microbiology*, **30**: 67-78.
- **Pollock H. M., Barry A. L., Gavan T. L., Fuchs P. C., Hansen S., Thornsberry C. L., Frankel H. & Forsythe S. B., 1986.** Selection of a Reference Lot of Mueller-Hinton Agar. *Journal of Clinical Microbiology*, **24**(1): 1-6.
- **Ponnampalam E. N., Bekhit A. E. D., Bruce H., Scollan N. D., Muchenje V., Silva P. & Jacobs J. L., 2019.** Production Strategies and Processing Systems of Meat: Current Status and Future Outlook for Innovation — A Global Perspective, In : Galanakis C. M., 2019 : Sustainable Meat Production and Processing, Eds. Academic Press. London (United Kingdom), 18.
- **Prabhu M., Naik M. & Manerikar V., 2019.** Quorum Sensing-Controlled Gene Expression Systems in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, In : Bramhachari P. V., 2019 : Implication of Quorum Sensing and Biofilm Formation in Medicine, Agriculture and Food Industry, Eds. Springer. Singapore (Singapore), 12.
- **Puig-Peña Y., Leyva-Castillo V., Tejedor-Arias R., Illnait-Zaragozí M. T., Aportela-López N., Camejo-Jardines A. & Ramírez-Areces J., 2020.** Antimicrobial Resistance in Bacteria Isolated from Foods in Cuba. *MEDDIC Review*, **22**(3): 40-45.
- RASRBA (2011) Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance aux Antibiotiques.
- **Reuter G., 1985.** Elective and Selective Media for Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **2**(1-2): 55-68.
- **Reza A., Sutton J. M. & Rahman K. M., 2019.** Effectiveness of Efflux Pump Inhibitors as Biofilm Disruptors and Resistance Breakers in Gram-Negative (ESKAPEE) Bacteria. *Antibiotics*, **8**(4): 229.
- **Rezac S., Kok C. R., Heermann M. & Hutkins R., 2018.** Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Frontiers in Microbiology*, **9**: 1785.
- **Robinson D. K. R., 2011.** Value Chains as a Linking-Pin Framework for Exploring Governance and Innovation in Nano-Involved Sectors: Illustrated for Nanotechnologies and the Food Packaging Sector. *European Journal of Law and Technology*, **2**(3): 1-28.
- **Rodrigues M. X., Lima S. F., Canniatti-Brazaca S. G. & Bicalho R. C., 2017.** The Microbiome of Bulk Tank Milk: Characterization and Associations with Somatic Cell Count and Bacterial Count. *Journal of Dairy Science*, **100**(4): 2536-2552.
- **Rodriguez Medina M. L., Tornadijo M. E., Carballo J. & Sarmiento R. M., 1995.** Microbiological Study of León Raw Cow-Milk Cheese, a Spanish Craft Variety. *Journal of Food Protection*, **58**(9): 998-1006.

- **Roostita R. and Fleet G. H., 1996.** The Occurrence and Growth of Yeasts in Camembert and Blue-Veined Cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, **28**(3): 393-404.
- **Ryan K. J., Schoenknecht F. D. and Kirby W. M., 1970.** Disc sensitivity testing. *Hospital Practice*, **5**: 91-100.
- **Samna Soumana O., Amadou I., Ibrahim A. & Gounga M., 2020.** Elaboration d'un plan de maîtrise et de contrôle des dangers au cours de la production de boisson gazeuse en bouteille PET à partir de la démarche HACCP. *European Scientific Journal*, **16**(3) : 295-317.
- **Sánchez Valenzuela A., Lavilla Lerma L., Benomar N., Gálvez A., Pérez Pulido R. & Abriouel H., 2013.** Phenotypic and Molecular Antibiotic Resistance Profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Different Traditional Fermented Foods. *Foodborne Pathogens and Disease*, **10**(2): 143-149.
- **Şanlıer N., Gökçen B. B. & Sezgin A. C., 2017.** Health Benefits of Fermented Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **59**(3): 506-527.
- **Sarkar D. J., Mukherjee I., Shakil N. A., Rana V. S., Kaushik P. & Debnath S., 2018.** Antibiotics in Agriculture: Use and Impact. *Indian Journal of Ethnophytopharmaceuticals*, **4**(1): 4-19.
- **Savado A. et Traore A., 2012.** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **5**(5) : 2057.
- **Savaiano D. A. and Hutkins R. W., 2020.** Yogurt, Cultured Fermented Milk, and Health: A Systematic Review. *Nutrition Reviews*, **0**(0): 1-16.
- **Schmidt J. L. et Daudin J.J., 1983.** Étude de l'homogénéité d'une population de levures isolées à partir de fromages de camembert. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*, **134**(3): 399-409.
- **Seixas R., Santos J. P., Bexiga R., Vilela C. L. & Oliveira M., 2014.** Short Communication: Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolates from Bovine Mastitis Cases in Portugal. *Journal of Dairy Science*, **97**(1): 340-344.
- **Shankar P. A. and Davies F. L., 1977.** Associative Bacterial Growth in Yogurt starters; Initial Observations on Stimulatory Factors. *Journal of the Society of Dairy Technology*, **30**: 28-30.
- **Sharpe M. E., Fryer T. F. & Smith D. G., 1966.** Identification of the Lactic Acid Bacteria, In : Gibbs B. M. and Skinner F. A., 2008 : Identification Method for Microbiologists Part A, Eds. Academic Press. London and New York, 65-79.
- **Singh H. and Bennett, R. J., 2002.** Milk and Milk Processing, In : Robinson R. K. 2002 : Dairy Microbiology Handbook 3rd Edition, Eds. Wiley-Interscience. New York (United States), 1.
- **Sirichoat A., Flórez A. B., Vázquez L., Buppasiri P., Panya M., Lulitanond V. & Mayo B., 2020.** Antibiotic Susceptibility Profiles of Lactic Acid Bacteria from the Human Vagina and Genetic Basis of Acquired Resistances. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(7): 2594.
- **Smith M., 2008.** The Contribution of Food Safety Management Systems to the Prevention of Deliberate Food Contamination, In : Alpas H. and Çirakoğlu P., 2008 : Food Chain Security, Eds. Springer. Dordrecht (Netherlands), 23.

- **Solano C., Echeverz M. & Lasa I., 2014.** Biofilm Dispersion and Quorum Sensing. *Current Opinion in Microbiology*, **18**: 96-104.
- **Talon R. & Leroy S., 2011.** Diversity and Safety Hazards of Bacteria Involved in Meat Fermentations. *Meat Science*, **89**(3): 303-309.
- **Tamime A. Y., 2002.** Fermented Milks: A Historical Food With Modern Applications-- A Review. *European Journal of Clinical Nutrition*, **56**(S4): S2-S15.
- **Tenover F. C., 2006.** Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *American Journal of Infection Control*, **34**(5S1): S3-S10.
- **Terzaghi B.E and Sandine W.E., 1975.** Improved medium for lactic Streptococci and their Bacteriophage. *Applied Microbiology*, **29**(6): 807-813.
- **Thumu S. C. R. and Halami P. M., 2012.** Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin. *Antonie van Leeuwenhoek*, **102**(4): 541-551.
- **Toomey N., Monaghan A., Fanning S., Bolton D. J., 2009.** Assessment of Antimicrobial Resistance Transfer between Lactic Acid Bacteria and Potential Foodborne Pathogens Using in Vitro Methods and Mating in a Food Matrix. *Foodborne Pathogens and Disease*, **6**(8): 925-933.
- **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.
- **Traub W. H., Spohr M. & Bauer D., 1987.** Tentative Inhibition Zone Criteria (Bauer-Kirby Agar Disk Diffusion Method) for Rifampin Against Staphylococci. *Chemotherapy*, **33**(6): 412-418.
- US Pharmacopoeia. 30th Edition. (2008)
- **van der Vorst J.G.A.J., 2010.** Simulation Modelling for Food Supply Chain Redesign, In : Mena C. and Stevens G., 2010 : Delivering Performance in Food Supply Chains, Eds. Woodhead. Cambridge (United Kingdom), 391.
- **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.
- **Virmani A., Pinto L., Binienda Z. & Ali S., 2013.** Food, Nutrigenomics, and Neurodegeneration—Neuroprotection by What You Eat! *Molecular Neurobiology*, **48**(2): 353-362.
- **Vissers M. M. M. and Driehuis F., 2009.** On-Farm Hygienic Milk Production, In : Tamime A. Y., 2009 : Milk Processing and Quality Management, Eds. Wiley-Blackwell. Oxford (United Kingdom), 9.
- **Wai S. N., Mizunoe Y., Takade A., Kawabata S. I. & Yoshida S. I., 1998.** *Vibrio cholerae* O1 Strain TSI-4 Produces the Exopolysaccharide Materials That Determine Colony Morphology, Stress Resistance, and Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(10): 3648-3655.
- **Wallace C. A., Sperber W. H. & Mortimore S. E., 2018.** Lessons Learned from Food Safety Successes and Failures, In : Wallace C. A., Sperber W. H. & Mortimore S. E., 2018 : Food Safety for the 21st Century: Managing HACCP and Food Safety Throughout the Global Supply Chain 2nd Edition, Eds. Wiley. Oxford (United Kingdom), 15-32.

- **Walls I. and Buchanan R., 2005.** Use of Food Safety Objectives as a Tool for Reducing Foodborne Listeriosis. *Food Control*, 16(9): 795-799.
- **Wang H. H., Manuzon M., Lehman M., Wan K., Luo H., Wittum T. E., Yousef A. & Bakaletz L. O., 2006.** Food Commensal Microbes as a Potentially Important Avenue in Transmitting Antibiotic Resistance Genes. *FEMS Microbiology Letters*, 254(2): 226-231.
- **Wang H., McEntire J.C., Zhang L., Li X. & Doyle M., 2012.** The Transfer of Antibiotic Resistance from Food to Humans: Facts, Implications and Future Directions. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 31(1): 249-260.
- **Wendlandt S., Shen J., Kadlec K., Wang Y., Li B., Zhang W.-J., Feßler A. T. Congming Wu C. & Schwarz S., 2015.** Multidrug Resistance Genes in Staphylococci from Animals That Confer Resistance to Critically and Highly Important Antimicrobial Agents in Human Medicine. *Trends in Microbiology*, 23(1): 44-54.
- WHO (1961) Standardization of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Tests. Geneva. Tech. Rep. Ser. No.210.
- WHO (1977) Expert Committee on Biological Standardization. Geneva. Tech. Rep. Ser. No.610.
- WHO (1994) Toxicological Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food, Food Addit. Series N. 33.
- WHO (1995) Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food, Tech. Rep. Series N. 851.
- WHO (2011) Tackling Antibiotic Resistance from a Food Safety Perspective in Europe. Copenhagen.
- WHO (2014) Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Geneva.
- **Wilbey R. A., 2002.** Microbiology of Cream and Butter, In : Robinson R. K. 2002 : Dairy Microbiology Handbook 3rd Edition, Eds. Wiley-Interscience. New York (United States), 164.
- **Wilkins M., Hall-Stoodley L., Allan R. N. & Faust S. N., 2014.** New Approaches to the Treatment of Biofilm-Related Infections. *Journal of Infection*, 69(S1): S47-S52.
- **Yan J. and Bassler B. L., 2019.** Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host & Microbe*, 26(1): 15-21.
- **Yelin I. and Kishony R., 2018.** Antibiotic Resistance. *Cell*, 172(5): 1136-1136.e1.
- **Zhao X., Yu Z. & Ding T., 2020.** Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Microorganisms*, 8(3): 425.
- **Zonenschain D., Rebecchi A. & Morelli L., 2009.** Erythromycin- and tetracycline-resistant lactobacilli in Italian fermented dry sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 107(5): 1559-1568.

Annexes

Annexe 01 : Milieux de culture**Milieu M17 (Terzaghi et Sandinen, 1975)**

Composition en g/L :

Tryptone	05.00
Peptone de soja	05.00
Extrait de viande	05.00
Extrait de levure	02.50
Acide ascorbique	00.50
Sulfate de magnésium	00.25
Bêta-glycérophosphate dissodique	19.00
Lactose	20.00
Agar-agar	20.00
pH 6.9 ± 0.2 à 25°C	

Le milieu M17 a été préparé à partir d'une préparation prête à l'emploi (**Conda-Pronadisa, Spain**) à raison de 37,25 g par litre, il a additionné ensuite de 2% de lactose.

Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

Composition en g/L :

Infusion déshydratée de boeuf	300.0
Hydrolysate de caséine	17.50
Amidon de maïs	01.50
Agar-agar	17.00
pH 7.3 ± 0.1 à 25°C	

Le milieu Mueller-Hinton a été utilisé directement sous forme de gélose prête à l'emploi après qu'il ait été fondu par passage au bain-marie et amené à 45°C environ.

Milieu MRS (de Man, Rogosa et Sharpe, 1960)

Composition en g/L:

Tryptone	10.00
Extrait de viande	10.00
Extrait de levure	04.00
Glucose	20.00
Monooléate de sorbitane (Tween 80)	1ml
Hydrogénophosphate de di-potassium	02.00
Acétate de sodium 3H ₂ O	05.00
Citrate de tri-ammonium	02.00
Sulfate de magnésium 7H ₂ O	00.20
Sulfate de manganèse 4H ₂ O	00.05
Agar-agar	20.00
pH 6.2 ± 0.2 à 25°C	

Pour le milieu MRS, les sels sont d'abord pesés dans un récipient à part contenant une faible quantité d'eau distillée, ils sont ajoutés par la suite aux éléments organiques dissous dans environ la moitié du volume final à l'aide d'un agitateur et d'un barreau magnétique. Le Tween 80 est ajouté en dernier, goutte à goutte, à l'aide d'une pipette Pasteur.

Milieu Trypticase Soja

Composition en g/L :

Tryptone	15.00
Peptone papainique de soja	05.00
Chlorure de sodium	05.00
Agar-agar	20.00
pH 7.3 ± 0.2 à 25°C	

Le milieu Trypticase Soja a été préparé à partir d'une préparation prête à l'emploi (**Conda-Pronadisa, Spain**) à raison de 30 g par litre.

Peptone saline (Straka et Stokes, 1957)

Composition en g/L :

Peptone	01.00
Chlorure de sodium	08.50
pH 7.0 ± 0.2 à 25°C	

Observations:

- Le volume doit être complété (qsp : « quantité suffisante pour ») dans une éprouvette graduée car plus précise.
- Le pH doit être vérifié pour chaque milieu de culture après avoir complété l'entièreté du volume.
- L'agar-agar est ajouté à raison de 2% en dernier lieu après la répartition des milieux de culture dans les flacons.
- La stérilisation de tous les milieux de culture, après leur préparation, a été effectuée dans un autoclave pendant une durée de 15 min à une pression de 1.06 bar et une température de 121°C. Dans le cas des bouillons répartis dans des tubes à essais, ces derniers étaient attachés ensemble par des élastiques et rassemblés dans des sachets bien serrés.