

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle. BENHENNEDA Houria Kenza

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie Appliquée

THÈME

**Présence de bactéries antibiorésistantes dans les aliments:
Détection, isolement et caractérisation biochimique**

Déposé en Octobre 2021

Jury:

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

Année Universitaire: 2020-2021

Sommaire

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures.....	v
Introduction.....	1

Partie I : Revue bibliographique

I. Les antibiotiques.....	3
1. Introduction.....	3
2. Utilisation des antibiotiques : Avantages et inconvénients.....	4
3. Résistance aux antibiotiques.....	6
3.1. Définition.....	6
3.2. Résistance intrinsèque.....	6
3.3. La résistance acquise.....	7
3.3.1. Résistance par mutation.....	7
3.3.2. Résistance par acquisition de gènes.....	10
3.4. Mécanismes biologique de la résistance aux antibiotiques.....	11
3.4.1. Dégradation enzymatique.....	11
3.4.2. Modification de la cible.....	12
3.4.3. Réduction de la perméabilité des membranes: intérieure et extérieure.....	12
II. Chaîne de production alimentaire comme source de résistance aux antibiotiques.....	13
1. Résistance aux antibiotiques dans les aliments.....	15
1.1. Vue d'ensemble.....	15
1.2. Produits végétaux: Fruits et Légumes.....	16
1.2.1. Exemples de bactéries résistantes aux antibiotiques.....	18
1.3. Produits animaux.....	21
1.3.1. Exemples de bactéries résistantes aux antibiotiques.....	23

Partie II : Présentation d'articles scientifiques

Article 1: Ready-to-Eat Dairy Products as a Source of Multidrug-Resistant Enterococcus Strains: Phenotypic and Genotypic Characteristics. Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., García-Solache M., 2020.....26

Article 2: Microbial occurrence and antibiotic resistance in ready-to-go food items. Cole M.L., Singh O.V., 2018. Journal of food Science and Thecnology. 55(7): 2600–2609.....42

Conclusion.....59

Références bibliographiques

Remerciements

En ce jour spécial, je souhaiterais ouvrir mon bal de remerciements en portant une immense reconnaissance à ma directrice de mémoire Dr. BENNAMA R. maître de conférences au département de biologie de l'Université de Mostaganem, d'avoir accepté de m'encadrer, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion et guider mon travail.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du Jury, Dr. BELKACEMI L. maître de conférences l'école supérieure d'agronomie de Mostaganem, ainsi que Dr. BENOURED F., maître de conférences au département de biologie, je tiens à dire que je suis infiniment sensible à l'honneur que vous me faites, en acceptant d'examiner mon travail.

J'adresse également mes remerciements à toute l'équipe pédagogique du département de biologie de Mostaganem, ainsi qu'aux professeurs ayant fourni des efforts durant mon parcours universitaire.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à mes très chers parents, pour leurs aides financiers et psychiques, d'avoir toujours été là pour moi et d'avoir cru en moi.

Ce mémoire rentre dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Appliquée, il étudiera et exposera un problème de santé alimentaire, afin de toucher toute la communauté scientifique ayant un lien avec ce sujet. Les articles scientifiques présentés sont d'une importance majeure, les méthodes cités et les résultats trouvés m'ont permis d'appuyer mes informations et établir un travail de fin d'étude adéquat.

Résumé

De nos jours, la prévalence de souches bactériennes antibio-résistantes isolées de différents produits alimentaires a atteint des niveaux dangereusement élevés, laissant l'homme face à des problématiques délicates d'environnement, de sécurité et de santé. Cette antibio-résistance mal couverte révèle le manque d'informations sur la présence de ce type de bactéries dans les produits alimentaires, élaborés tout au long de la chaîne de production alimentaire. Ainsi, ce travail a été proposé pour compiler des données sur ce phénomène qui diffuse silencieusement, via les denrées alimentaires, en présentant, dans un premier temps, une revue bibliographique soulignant la question. Dans un second temps, l'intérêt a été porté sur l'étude de deux articles scientifiques, faisant lien entre ce phénomène et l'alimentation. Le premier de Chajęcka-Wierzchowska et al (2020), s'est basé sur la recherche des *Enterococcus* antibio-résistants dans des produits laitiers fermentés prêts-à consommer (*i.e.* des types de fromages et autres produits laitiers). Les résultats de cette recherche ont montré la prédominance des espèces *E. faecium* (53.4%) et *E. faecalis* (34.4%). Parmi les souches testées, les pourcentages de résistance les plus élevés ont été observés avec la streptomycine (29,1 %), l'érythromycine (14,3 %), et la tétracycline (11,6%). Des gènes de résistance aux aminosides, à la tétracycline et aux macrolides ont aussi été identifiés. Par ailleurs, les résultats du second article publiés en 2018 par Cole et Singh ont aussi signalé la présence de bactéries antibio-résistantes et qui pourraient être non-pathogènes, dans des échantillons d'aliments prêts-à-emporter (*i.e.* aliments en conserve, ensachés, et pour bébés). L'identification par le séquençage de l'ARN 16S a révélé la dominance d'isolats de *Bacillus sp*, de *Staphylococcus sp*, et de *Micrococcus sp.*, qui ont montré une résistance à l'ampicilline, à la streptomycine, au chloramphénicol et à la kanamycine.

Mot clés: Bactéries, Présence, Aliments, Antibiotiques, résistance, Détection.

Abstract

Nowadays, the prevalence of antibiotic resistant bacterial strains isolated from various food products has reached dangerously high levels, leaving man facing delicate environmental, safety and health issues. This poorly covered antibiotic resistance reveals the lack of information on the presence of this type of bacteria in food products, developed throughout food production chain. Thus, this work was proposed to compile data on this phenomenon that diffuses silently *via* foodstuffs, by presenting, firstly, a bibliographical review, to outline the question. Secondly, interest was focused on the study of two scientific papers, making a link between this phenomenon and food. The first by Chajęcka-Wierzchowska et al (2020) was based on the research of antibiotic-resistant *Enterococcus* in ready-to-eat fermented dairy products (*i.e.* types of cheese and other dairy products). The results of this research showed the predominance of the species *E. faecium* (53.4%) and *E. faecalis* (34.4%). Among the strains tested, the highest resistance percentages were observed with streptomycin (29.1%), erythromycin (14.3%), and tetracycline (11.6%). Genes for resistance to aminoglycosides, tetracycline and macrolides have also been identified. The results of the second paper published in 2018 by Cole and Singh, also reported the presence in samples of ready-to-go food (*i.e.*, canned, bagged, and baby foods), of antibiotic-resistant bacteria that could be non-pathogenic. Identification by 16S-RNA sequencing revealed the dominance of isolates of *Bacillus* sp, *Staphylococcus* sp, and *Micrococcus* sp, which showed resistance to ampicillin, streptomycin, chloramphenicol and kanamycin.

Keyword: Bacteria, Presence, Food, Antibiotics, resistance, Detection.

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.

RND: Résistance Nodulation Division.

HGT: Transfert Horizontal d'éléments Génétiques.

PBP: Penicillin Binding Protein.

MFS: Superfamille des Facilitateurs Majeurs.

MATE: Extrusion Multi-drogue et Composé Toxique.

SMR: petite Résistance Multidroque.

PACE: Efflux de Composés Antimicrobiens Protéobactériens.

SHU: Syndrome Hémolytique et Urémique.

Tableaux cités dans la revue bibliographique

Tableau I: Modes d'action des antibiotiques couramment utilisés.....	3
---	----------

Tableaux cités dans l'article de: Chajęcka-Wierzchowska et al., (2020)

Tableau I: Occurrence des espèces d' <i>Enterococcus</i> dans les échantillons d'aliments laitiers.....	32
Tableau II: Nombre (%) de souches d'entérocoques résistantes aux antibiotiques isolées à partir d'échantillons de produits laitiers.....	33
Tableau III: Gènes de résistance aux antibiotiques isolés des produits laitiers.....	34
Tableau IV: Phénotypes présents dans les souches résistantes à des concentrations élevées d'aminoglycosides.....	34
Tableau V : Profils de gènes codant pour les enzymes aminosides (AME) dans des souches résistantes à des concentrations élevées de streptomycine.....	35
Tableau VI : Diversité génotypique des souches d'entérocoques résistantes à la tétracycline (TETR).....	36
Tableau VII: Diversité génotypique des souches d'entérocoques résistantes à l'érythromycine (ER).....	37

Tableaux cités dans l'article de: Cole et Singh, (2018)

Tableau I: Résistance aux antibiotiques parmi les microorganismes identifiés par l'ARNr 16S à partir de divers isolats alimentaires.....	49
---	-----------

Figures citées dans la revue bibliographique

Figure 1: Conséquences de la surutilisation des antibiotiques et la propagation des gènes de résistances.....	5
Figure 2: Evolution de la résistance aux antibiotiques dans la cellule bactérienne.....	9
Figure 3: Mécanismes de transfert horizontal de gènes.....	10
Figure 4: Chaîne de production alimentaire.....	14

Figures citées dans l'article de: Cole et Singh., (2018)

Figure 1: Présence microbienne dans les aliments en conserve.....	47
Figure 2: Présence microbienne dans les aliments ensachés.....	48
Figure 3: Arbre phylogénétique basé sur la séquence du gène de l'ARNr 16S.....	52

Introduction

Introduction

Le monde de santé avec la découverte des antibiotiques pensait que la bataille contre les maladies infectieuses était gagnée (**Reygaert, 2018**). Cependant, suite à l'utilisation intensive et inappropriée des antibiotiques, des bactéries résistantes sont apparues, au fil des années, et des problèmes ont commencé à être rencontrés, pour le traitement des infections causées par ces bactéries antibio-résistantes (**Cesur et Demiröz, 2013**).

L'évolution de ce phénomène de résistance a été décrite par certains auteurs comme une pandémie (**Anderson, 1999**), qualifiée même, de pandémie silencieuse (**Sharma et al., 2018**). La résistance aux antibiotiques a réussi à annuler la capacité des antibiotiques, à combattre les infections, à rendre le microbiote intestinal malléable, et par conséquent évolue, en un réservoir de gènes de résistance, même dès la petite enfance (**Tsigalou et al., 2020**).

En outre, il faut citer que la chaîne alimentaire, de la production à la cuisine du consommateur, peut être un contributeur au développement, à la persistance et à la dissémination de microorganismes résistants, y compris les agents pathogènes d'origine alimentaire et les bactéries commensales (**Wang et al., 2012**).

Les bactéries peuvent avoir une résistance naturelle (intrinsèque) ou acquise à un ou plusieurs types d'antibiotiques. Après l'acquisition des gènes de résistance, et afin de se protéger de divers agents antimicrobiens, les bactéries utilisent plusieurs types de mécanismes de résistance, à savoir: l'inactivation des antibiotiques (interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire, comme avec les bêta-lactames et les glycopeptides), la modification de la cible (inhibition de la synthèse, avec les macrolides et les tétracyclines), ou par dégradation enzymatique (**Giedraitienė et al., 2011**).

Comme le signale le titre de ce mémoire «Présence de Bactéries antibio-resistantes dans les aliments: Détection, isolement, caractérisation biochimique», cette étude a pour but de démontrer l'existence de ce type de bactéries dans certains produits alimentaires.

Ce mémoire est structuré en deux parties: la partie bibliographique et la présentation d'articles. La partie expérimentale n'a pas pu être réalisée à cause de la pandémie du Covid-19.

- **Partie bibliographique:**

Définit les antibiotiques, l'antibio-résistance chez les bactéries et sa relation avec les produits alimentaires et démontre l'implication de la chaîne de production alimentaire dans la propagation du phénomène de l'antibio-résistance chez les bactéries d'origine alimentaire.

- **Partie présentation d'articles:**

Les articles scientifiques choisis et présentés dans ce mémoire offrent une méthodologie très claire et des données scientifiques intéressantes, assurant ainsi une sorte d'alternative au travail expérimental prévu et non-réalisé.

Revue Bibliographique

I. Les antibiotiques

1. Introduction

Les antimicrobiens comprennent toute substance qui a un effet d'inhibition de croissance ou de destruction sur les microorganismes dans un environnement clinique ou pour réduire les charges bactériennes dans les matériaux et les surfaces. Ils comprennent les antibiotiques, qui sont utilisés pour traiter les infections bactériennes chez les humains et les animaux, ainsi que les biocides chimiques, qui sont utilisés pour la désinfection dans l'environnement de transformation des aliments (Verraes et al., 2013). Les antibiotiques sont des agents antimicrobiens de faible poids moléculaire produits par des microorganismes et qui ont la capacité d'inhiber ou de tuer d'autres microorganismes, en particulier des bactéries (WHO, 2017). Ils sont généralement classés selon leur structure moléculaire et leurs mécanismes antimicrobiens. Ces mécanismes d'action interrompent la synthèse des composants structurels ou modifient les fonctions métaboliques propres aux cellules bactériennes cibles. Sur cette base au moins sept grands groupes d'antibiotiques ont été décrits. Ceux-ci comprennent les β -lactamines (inhibent la synthèse de la paroi cellulaire), les aminosides (synthèse des protéines), les macrolides (synthèse des protéines), les tétracyclines (synthèse des protéines), la daptomycine (fonction de la membrane cellulaire), et la platensimycine (biosynthèse des acides gras) (Tableau I) (Becker, 2013; Peterson et Kaur, 2018).

Tableau I: Modes d'action des antibiotiques couramment utilisés, adapté d'après Davies et Davies, (2010).

Classe d'antibiotiques	Exemples	Cible
β -lactames	Pénicillines, céphalosporines, pénèmes, monobactames	Biosynthèse du peptidoglycane
Aminoglycosides	Gentamicine, streptomycine, spectinomycine	Traduction
Glycopeptides	Vancomycine, teicoplanine	Biosynthèse du peptidoglycane
Tétracyclines	Minocycline, tigécycline	Traduction
Macrolides	Érythromycine, azithromycine	Traduction
Lincosamides	Lincosamides	Traduction
Streptogramines	Synercide	Traduction
Oxazolidinones	Linézolide	Traduction
Phénicolés	Chloramphénicol	Traduction
Quinolones	Ciprofloxacine	Réplication de l'ADN
Pyrimidines	Triméthoprime	Métabolisme C ₁
Sulfonamides	Sulfaméthoxazole	Métabolisme C ₁
Rifamycines	Rifampine	Transcription
Lipopeptides	Daptomycine	Membrane cellulaire
Peptides cationiques	Colistine	Membrane cellulaire

2. Utilisation des antibiotiques: Avantages et inconvénients

L'introduction des antibiotiques dans l'utilisation clinique a sans doute été la plus grande percée médicale du 20^e siècle (**Katz et Baltz, 2016**). En plus de traiter les maladies infectieuses, ils ont rendu possibles de nombreuses procédures médicales modernes, y compris le traitement du cancer, les greffes d'organes et la chirurgie à cœur ouvert. Cependant, l'utilisation abusive de ces composés a entraîné une augmentation rapide de la résistance aux antimicrobiens, certaines infections étant désormais incurables (**Prescott, 2014; Matthew et al., 2019**).

En santé animale, les antibiotiques sont aussi utilisés dans les traitements vétérinaires du bétail et des animaux domestiques. Ils ont même été introduits en alimentation animale, comme promoteurs de croissance (**Rushton, 2015; Van et al., 2020**). En effet, la consommation d'antibiotiques est en augmentation et entre les années 2000 et 2010, l'augmentation de leur utilisation dans le monde pour la santé humaine a été estimée à 36% (**Van Boeckel et al., 2014**). Ces données révèlent d'une utilisation généralisée des antibiotiques qui pourrait favoriser le développement d'une résistance aux antibiotiques. Cette situation a pris une forte emprise sur le système de santé à l'échelle mondiale, car les préoccupations concernant la résistance au régime médicamenteux disponible restreignent les options thérapeutiques disponibles pour traiter une maladie (**Sultan et al., 2018**).

De plus, les antibiotiques, comme d'autres produits pharmaceutiques, pénètrent dans l'environnement via l'utilisation par les patients et les animaux, par les usines de fabrication et/ou une élimination inappropriée (**Figure 1**). Les points d'entrée communs dans l'environnement à partir de l'utilisation thérapeutique humaine sont les effluents des hôpitaux, les stations d'épuration des eaux usées domestiques, ainsi que les lixiviats des sites d'enfouissement. Les antibiotiques peuvent pénétrer directement dans les eaux de surface à partir des stations d'épuration ou être transférés par ruissellement de surface. Les eaux souterraines peuvent être exposées à partir de terres agricoles traitées avec des biosolides de boues d'épuration comme source d'engrais (**Kümmerer, 2009; Le Page et al., 2017**).

Ces descriptions sus-citées sur l'utilisation accrue et aux rejets d'antibiotiques par les consommateurs ou les installations de production et de formulation de médicaments représentent des « points chauds », pour le développement d'une résistance aux antibiotiques (**Le Page et al., 2017; Peterson et Kaur, 2018**).

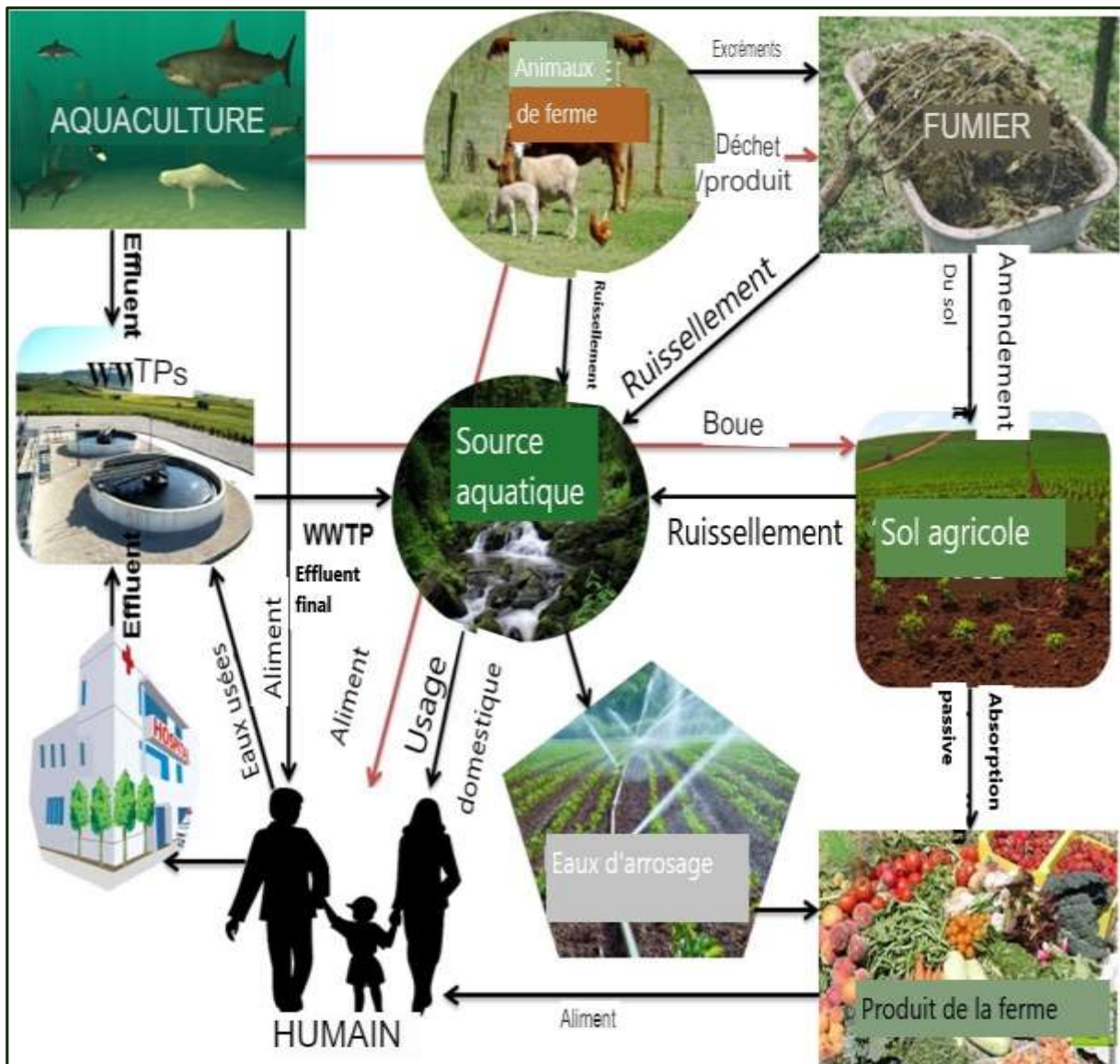


Figure1: Conséquences de la surutilisation des antibiotiques et la propagation des gènes de résistances (Iwu et al., 2020).

- Une grande partie des antibiotiques dispensés en médecine, en aquaculture et en élevage est excrétée dans les matières fécales et l'urine par les humains, les poissons et les animaux sous une forme chimique partiellement brisée ou inchangée et rejetée dans les eaux usées, les boues et le fumier. Ces agents et les souches résistantes aux antibiotiques naturellement sélectionnées sont ensuite transférés vers d'autres sections de l'agro-écosystème telles que les plans d'eau de surface, les eaux d'irrigation et les sols agricoles, et finissent par se retrouver dans les cultures vivrières destinées à la consommation humaine et animale, entraînant de graves conséquences pour la santé. Le mouvement des agents antimicrobiens est représenté à l'aide de flèches linéaires.

3. Résistance aux antibiotiques

3.1. Description et Définition

La résistance aux antibiotiques se produit lorsque les bactéries changent de manière à réduire ou à éliminer l'efficacité des antibiotiques (**Bisht et al., 2009; Read et al., 2014**). Ces changements sont principalement considérés comme un processus évolutif entraîné par la pression sélective imposée par l'utilisation massive des antibiotiques (**Martinez, 2009; Read et al., 2014**).

La définition clinique de la résistance est basée sur la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui définit *in vitro*, les niveaux de sensibilité ou de résistance de souches bactériennes spécifiques à un antibiotique donné (**Martinez et al., 2009**). Sur cette base, la définition de la résistance reporte à une souche dont la CMI devient supérieure à celle de la souche parentale sauvage correspondante (**Martinez et al., 2015; Bengtsson-Palme et al., 2018**). Ce qui signifie que les valeurs de la CMI tombent des plages habituelles et la bactérie n'est pas inhibée par une concentration systémique habituellement réalisable d'un antibiotique, et avec un schéma posologique normal. Ainsi, les bactéries survivent et continuent à se multiplier, causant plus de dommages (**Bisht et al., 2009**).

Quelles que soient les définitions proposées pour la décrire, la résistance impliquée dans la réduction de la sensibilité aux antibiotiques est classée en deux types distincts: intrinsèque et acquise (**Coculescu, 2009; Li et Webster, 2018**).

3.2. Résistance intrinsèque

Certaines espèces bactériennes présentant une faible sensibilité intrinsèque aux antibiotiques ont une origine environnementale des habitats, où la charge antibiotique n'est pas élevée (**Martinez, 2009**). La résistance intrinsèque aux antibiotiques pourrait avoir été sélectionnée au cours de l'évolution bactérienne, sans pression sélective des antibiotiques, pour couvrir des fonctions, autres que la résistance aux antibiotiques (**Alonso et al., 2001**). Les bactéries sont dites avoir une «résistance intrinsèque» à un antibiotique lorsque leurs caractéristiques normales les rendent immunisées contre le mécanisme d'action de l'antibiotique (**Rosenblatt-Farrell, 2009**). Les bactéries peuvent donc avoir une résistance naturelle à un antibiotique, c'est-à-dire qu'elles peuvent se développer et se multiplier en présence de concentrations maximales d'antibiotiques tolérées par l'organisme, leur développement n'étant aucunement influencé par cet antibiotique (**Coculescu, 2009**). Par

exemple, la résistance aux aminosides est universelle chez les bactéries anaérobies. Cette résistance commune et intrinsèque n'est pas le résultat d'une diminution de la sensibilité de la cible au médicament; elle est au contraire le résultat de l'échec de l'antibiotique à atteindre sa cible, par l'absence d'un système de transport actif qui fournit l'énergie nécessaire à la phase énergétique pour l'absorption de l'antibiotique **(Rasmussen et al., 1997; Krause et al., 2016)**. Aussi, certaines espèces de bactéries, telles que les mycoplasmes, parce qu'elles sont dépourvues de paroi cellulaire, sont intrinsèquement résistantes aux antibiotiques, tels que les bêta-lactames et les glycopeptides qui ciblent la paroi cellulaire **(Reygaert, 2016)**.

3.3. Résistance acquise

La résistance acquise se produit lorsqu'un organisme normalement sensible développe une résistance, par le biais d'un certain type de modification génétique. L'acquisition de la résistance conduit généralement à des sauts discrets dans les valeurs de la CMI d'un organisme, et donc à des distributions bi- ou polymodales claires des CMIs **(Boerlin et White, 2013)**.

La résistance bactérienne aux antibiotiques peut, en effet, résulter soit par accumulations de mutations, soit par acquisition de gènes de résistance étrangers **(Martinez, 2009; Barraud et al., 2018)**, ou d'une combinaison de ces mécanismes **(Boerlin et White, 2013)**.

3.3.1. Résistance par mutation

Il est supposé que les mutations se produisent à la suite d'erreurs au cours du processus de réplication de l'ADN **(Rosenberg, 2001; Galhardo et al., 2007)**. Les mutations dans les gènes cibles des antibiotiques étaient censées être la principale cause de résistance aux antibiotiques au début de l'ère des antibiotiques **(Martinez et Baquero, 2000)**. De même, il a été rapporté que les mutations se produisent à une fréquence relativement faible chez les bactéries. Des mutations d'une telle fréquence peuvent jouer un rôle important dans l'émergence de mutants résistants **(Martinez et Baquero, 2000; Couce et Blázquez, 2009)**. Cependant, il a été rapporté que les taux de mutation *in vitro* sont faiblement impliqués dans l'émergence de la résistance clinique, pour les antibiotiques couramment utilisés **(Sommer et al., 2017; Andersson et al., 2020)**.

Les mutations de résistance ne sont par ailleurs, transférées que verticalement; elles ne sont pertinentes que pour les clones hébergeant la mutation **(Sommer et al., 2017; Gil-Gil et al.,**

2021). Dans ce cas, la sélection clonale et l'expansion clonale associée, représente l'élément principal impliqué dans la propagation de ce phénomène (**Martínez et Baquero, 2014; Gil-Gil et al., 2021**). De plus, la résistance par mutation constitue un problème pour le patient infecté par des bactéries présentant de telles mutations. Par conséquent, elle pourrait devenir un problème de santé publique mondial, en raison de l'expansion clonale de ces mutants (**Gil-Gil et al., 2021**).

Trois principaux types de gènes intrinsèques (qui préexistent dans le génome de la population sensible de type sauvage) sont pertinents pour l'émergence de mutants résistants aux antibiotiques, à savoir: (i) les gènes impliqués dans la synthèse et le positionnement cellulaire de la cible antibiotique, les mutations de ces gènes peuvent être appelées mutations de la structure cible; (ii) les gènes impliqués dans l'accès ou le transport de l'antibiotique à la cible (y compris ceux nécessaires à l'activation de l'antibiotique anciennement inactif), les mutations de ces gènes sont appelées mutations d'accès à la cible ; et (iii) les gènes impliqués dans la protection de la cible contre l'antibiotique y compris la détoxification, par des enzymes modifiant les antibiotiques ou l'efflux des composés antibactériens, les mutations activant l'expression de ces gènes sont appelées mutations de protection de la cible (**Figure 2**) (**Martinez et Baquero, 2000**).

La plupart des mutations modifient les sites de liaison de l'antibiotique sur des cibles moléculaires, en augmentant l'expression des pompes d'efflux endogènes (**Figure 2**). Dans certains cas, ces mutations provoquent des changements d'acides aminés qui rendent une pompe plus efficace pour extruder les antibiotiques hors de la cellule (**Fernández et Hancock, 2012**). Par exemple, **Vettoretti et al. (2009)** ont démontré pour la première fois que la pompe du système MexXY peut évoluer dans des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de patients atteints de mucoviscidose; ils ont découvert qu'une mutation conduisant à un changement dans la substitution F1018L dans le transporteur de résistance-nodulation-division cellulaire (RND) MexY était capable d'augmenter la résistance induite par la pompe d'efflux MexXY aux aminosides, céfépime et fluoroquinolones (**Vettoretti et al., 2009**).

La résistance à la vancomycine, par exemple, nécessite jusqu'à six mutations dans différents gènes entraînant un remodelage de l'enveloppe cellulaire, en particulier à des changements dans la biosynthèse du peptidoglycane, pour réduire l'accès de l'antibiotique à la cible mortelle (**Foster, 2017**).

Les mutations de résistance entraînent un coût de remise en forme chez certaines espèces, car elles ciblent des fonctions biologiques importantes dans la cellule. Par exemple, la résistance aux fluoroquinolones chez les pseudomonades peut provoquer une altération de la motilité, et la résistance aux aminosides peut altérer la structure du ribosome et ainsi interférer avec les fonctions cellulaires de base (Melnyk et al., 2014). Aussi, chez *S. aureus* lors de l'acquisition d'une résistance à la méthicilline, le taux de croissance de la bactérie est diminué (Reygaert, 2016).

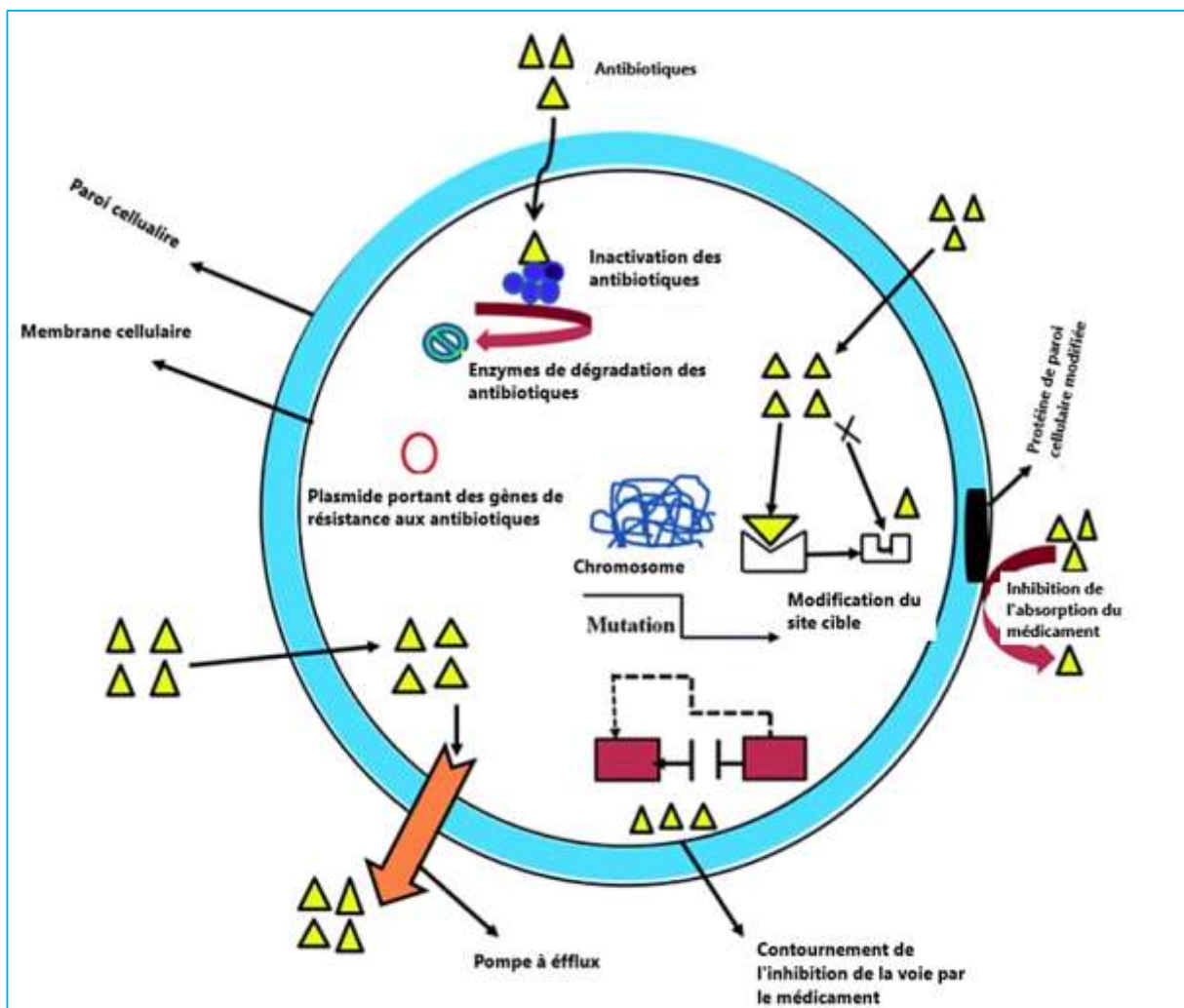


Figure 2: Evolution de la résistance aux antibiotiques dans la cellule bactérienne (Ndagi et al., 2020).

3.3.2. Résistance par acquisition de gènes

L'acquisition de gènes de résistance se produit par transfert horizontal d'éléments génétiques (HGT) (Evans et al., 2020) (Figure 3). Le transfert de gènes entre bactéries d'un même genre est très fréquent, mais des gènes peuvent également être transférés entre différents genres (Boto, 2010). La transmission de gènes à médiation plasmidique est la voie la plus courante pour l'acquisition de gènes de résistance chez les bactéries (Fernandez et Hancock., 2012; Partridge et al., 2018). Par contre, certaines bactéries telles que *Acinetobacter spp* ont montré qu'elles sont capables d'incorporer du matériel génétique provenant directement de l'environnement extérieur (Uche et al., 2021).

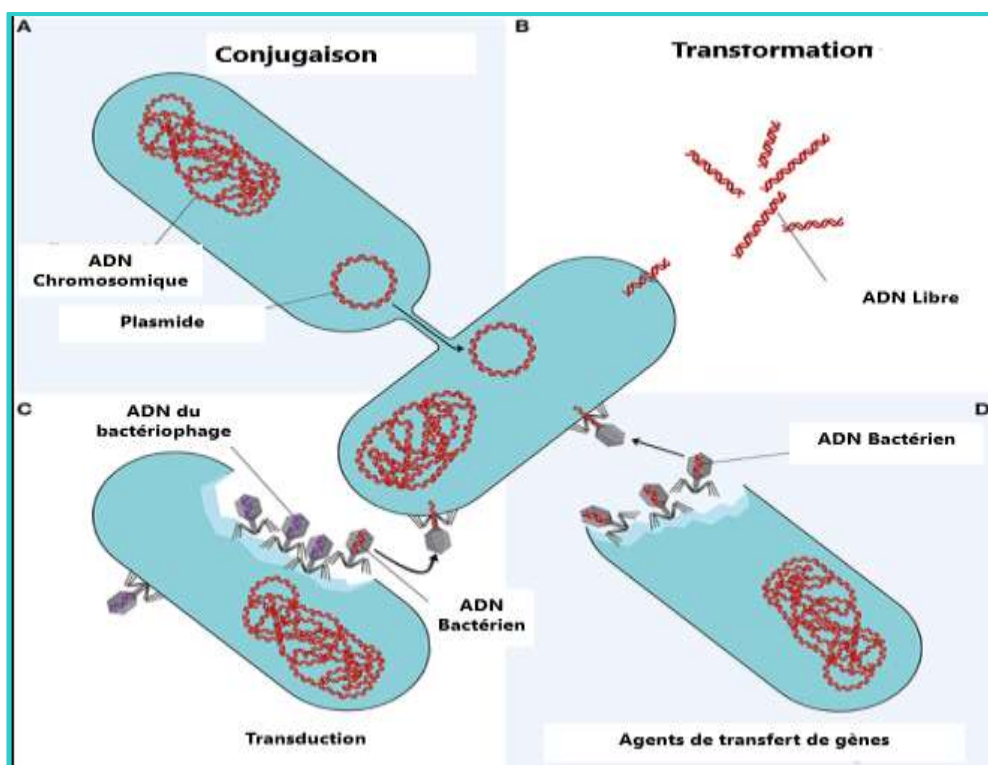


Figure 3: Mécanismes de transfert horizontal de gènes (Von Wintersdorff et al., 2016).

- Chaque quadrant représente un mécanisme différent de transfert de gènes. **(A):** La conjugaison est un processus nécessitant un contact de cellule à cellule via des pili de surface cellulaire ou des adhésines, par lequel l'ADN est transféré de la cellule donneuse à la cellule receveuse. **(B):** La transformation est l'absorption, l'intégration et l'expression fonctionnelle de fragments nus d'ADN extracellulaire. **(C):** Grâce à une transduction spécialisée ou généralisée, les bactériophages peuvent transférer l'ADN bactérien d'une cellule donneuse précédemment infectée à la cellule receveuse. Au cours de la transduction généralisée, l'ADN bactérien peut être accidentellement chargé dans la tête du phage (présenté comme un phage avec un brin d'ADN rouge). Au cours de la transduction spécialisée, l'ADN génomique voisin de l'ADN du prophage est co-excisé et chargé dans un nouveau phage (non illustré). **(D):** Les agents de transfert de gènes (GTA) sont des particules de type bactériophage portant des fragments aléatoires du génome de la cellule productrice. Les particules de GTA peuvent être libérées par lyse cellulaire et se propager à une cellule receveuse.

Il existe trois mécanismes principaux de HGT entre bactéries: la conjugaison, la transformation et la transduction (**Huddleston, 2014; Von Wintersdorff et al., 2016**). La conjugaison est le transfert d'ADN qui se produit entre des cellules bactériennes vivantes nécessitant un contact direct entre le donneur et la cellule receveuse. La transduction est un processus de transfert médié par les bactériophages et enfin, la transformation, un processus qui nécessite un système d'absorption d'ADN pour attirer l'ADN dans une cellule receveuse (**Verraes et al., 2013; Sun et al., 2019**).

Cependant, il a rapporté que la conjugaison était la plus impliquée dans le transfert de gènes de la résistance aux antibiotiques (**Leungtongkam et al., 2018**). La conjugaison chez les bactéries Gram-négatif suit un mécanisme général, tant dis que les bactéries Gram-positif utilisent des mécanismes alternatifs, pour atteindre le contact cellulaire (**Verraes et al., 2013**).

L'émergence mondiale de plasmides codant pour la résistance aux antibiotiques représente un danger pour la santé humaine et la société. Il est connu que les mutations chromosomiques sont héritées verticalement par fission bactérienne (**Zwanzig et al., 2019**). Le transfert horizontal reste beaucoup moins dangereux que le transfert vertical, car ce dernier peut conférer des propriétés bénéfiques à la cellule bactérienne (exemple, les gènes de résistance aux antibiotique et de virulence) (**Bolotin et Hershberg, 2017**).

3.4. Mécanismes biologique de la résistance aux antibiotiques

Les bactéries peuvent être résistantes aux antibiotiques en utilisant plusieurs mécanismes: dégradation enzymatique des antibiotiques, modification de la cible des antibiotiques, modification de la perméabilité de la paroi cellulaire bactérienne et voies alternatives pour échapper à l'activité (**Verraes et al., 2013**). Il est important de noter que différents agents antimicrobiens ont des modes d'action distincts contre divers microorganismes et la puissance des agents antimicrobiens est largement influencée par la nature de leur structure et le degré d'affinité à certaines cible des sites au sein des cellules microbiennes (**Dowling et al., 2017**).

3.4.1. Dégradation enzymatique

Aussi appelée, la modification enzymatique des antibiotiques, est un mécanisme de résistance très courant, certaines recherches ont montré des exemples sur les enzymes β -lactamases hydrolysant le cycle β -lactame des antibiotiques -lactames tels que les

céphalosporines, qui sont principalement préoccupantes chez les bactéries Gram-négatives, comme il existe un autre groupe d'antibiotique auxquels la résistance est principalement médiée par la dégradation enzymatique sont les aminosides, où l'inactivation est causée par les acétyltransférases, les nucléotidyltransférases et les phosphotransférases (**Wright, 2006**). Chacune de ces enzymes existe dans de nombreuses variantes ayant chacune un spectre spécifique pour un ou plusieurs antibiotiques (**Verraes et al., 2013**), un exemple chez d' *E. coli* où son principal mécanisme de résistance aux aminosides, est une modification enzymatique impliquant les trois familles d'enzymes cités par (**Wright., 2006; Dowling et al., 2017**).

3.4.2. Modification de la cible

Des études ont montré que le contournement de la cible implique la production de cibles d'antibiotiques supplémentaires qui ne sont pas sensibles à la liaison des antibiotiques. Ce mécanisme de résistance peut être utilisé par les bactéries pour résister à plusieurs classes d'antibiotiques, notamment, les glycopeptides, les lincosamides, les macrolides, les streptogramines, et les aminosides (**Yeats et al., 2002**).

3.4.3. Réduction de la perméabilité des membranes: intérieure et extérieure

La sensibilité des bactéries à un antibiotique particulier est déterminée par l'équilibre entre l'absorption et l'élimination des antibiotiques. Les bactéries utilisent une stratégie pour réduire la quantité d'antibiotique capable de traverser la membrane cellulaire bactérienne, pour développer une résistance aux antibiotiques. Ces mécanismes par lesquels les bactéries y parviennent comprennent l'apparition de canaux protéiques diminués sur la membrane externe bactérienne pour diminuer l'entrée de médicament et/ou la présence de pompes d'efflux, pour diminuer la quantité de médicament accumulée dans les cellules (**De Oliveira et al., 2020**). Des études ont donné des exemples sur les porines, en expliquant que, la perte ou la modification de la porine OprD de *P. aeruginosa* est liée à une sensibilité réduite aux carbapénèmes, et même chez *Acinetobacter baumannii* la perte ou l'inactivation de CarO est associée à une résistance à l'imipénème (**Santaji et Indrawattana, 2016; De Olivera et al., 2020**).

L'expression des pompes à efflux bactériennes qui expulsent activement les médicaments hors de la cellule, contribue également grandement à la résistance aux antimicrobiens (**De Oliviera et al., 2020**). Ces pompes expulsent le médicament de la cellule à une vitesse

élevée, ce qui signifie que les concentrations de médicament ne sont jamais suffisamment élevées, pour provoquer un effet antibactérien (**Santaji et Indrawattana., 2016**).

Les bactéries Gram négatif sont plus résistantes par la présence de la membrane externe. Les bactéries Gram positif manquent de cette couche importante, ce qui rend les bactéries Gram négatif plus résistantes aux antibiotiques que les Gram positif, la principale raison de la résistance à un large éventail d'antibiotiques, et sont considérées comme source principale d'infections nosocomiales (Bacille Gram négatif), pouvant provoquer des maladies graves chez l'homme, en particulier chez les personnes immunodéprimées (**Breijyeh et al., 2020**).

II. Chaîne de production alimentaire comme source de résistance aux antibiotiques

La chaîne de production alimentaire fait référence aux nombreuses étapes et pratiques à travers lesquelles les matières premières agricoles et les intrants sont transformés en produits alimentaires comestibles, qui sont consommés par des utilisateurs finaux (consommateurs). Il s'agit d'une transformation de la production primaire, en passant par la fabrication et la distribution, jusqu'à la vente au détail (**Figure 4**) (**Stringer, 2005; Nesheim et al., 2015**). D'autres définitions incluent une attention particulière aux environnements biophysiques et sociaux/institutionnels dans lesquels la chaîne de production s'opère (**Nesheim et al., 2015**).

La chaîne de production ou d'approvisionnement alimentaire comprend donc tous les processus (production, fabrication, distribution, vente et consommation) qui décrivent le flux des aliments de la ferme (champ) à la table des consommateurs. Chaque activité de la chaîne nécessite des ressources humaines et naturelles, et si une partie de la chaîne est en danger, cela affecte l'ensemble de la chaîne (**Bendeković et al., 2015**).

Une chaîne d'approvisionnement peut être soumise ou être confrontée à de multiples risques, avec des agriculteurs et des entreprises confrontés à des risques provenant de différentes sources (**Jaffee, 2010**); et la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques, tout au long de la chaîne pourrait présenter un risque particulier pour le consommateur (**Hölzel et al., 2018**).

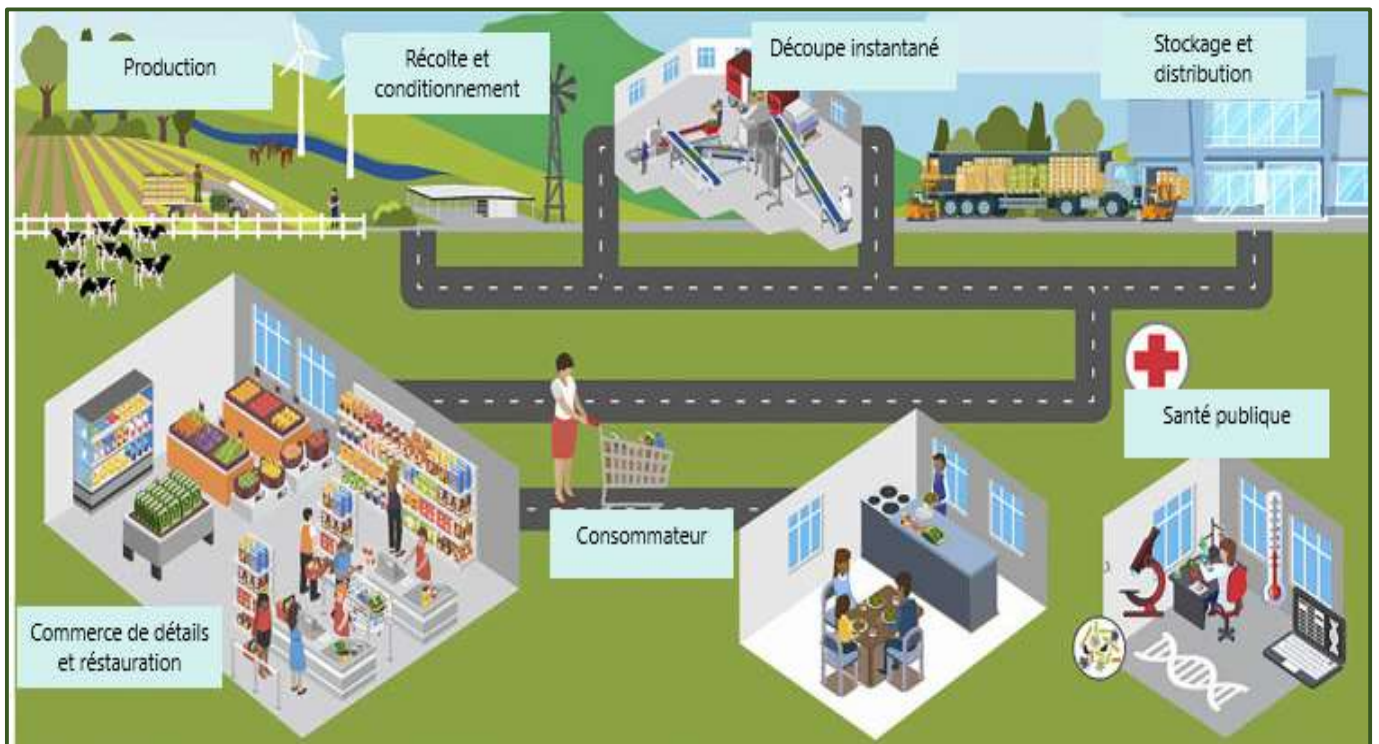


Figure 4: Chaîne de production alimentaire (Donaghy et al., 2021).

1. Résistance aux antibiotiques dans les aliments

1.1. Vue d'ensemble

La résistance aux antibiotiques est une menace mondiale majeure pour la santé publique. Les maladies qui étaient autrefois faciles à traiter avec des antibiotiques, deviennent de plus en plus difficiles à guérir et plus coûteuses à traiter. Les infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques, telles que *Salmonella*, peuvent entraîner des problèmes de santé plus graves que les infections par des bactéries qui ne sont pas résistantes aux antibiotiques (**National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), 2019**).

La contamination des aliments par des bactéries résistantes aux antimicrobiens et/ou des gènes de résistance aux antimicrobiens peut survenir de sources diverses. Les bactéries résistantes aux antimicrobiens peuvent être trouvées dans le sol, dans l'eau et dans les matières fécales humaines ou animales (**Verraes et al., 2013; Manyi-Loh et al., 2018**).

La contamination des produits animaux commence lors de l'abattage et se propage tout au long de la chaîne d'approvisionnement alimentaire (**Nadimpalli et al., 2018**). Même si des méthodes de transformation des aliments sont appliquées afin de tuer les cellules bactériennes; les cellules mortes peuvent rester intactes ou être lysées et libèrent des gènes de résistance aux antibiotiques (**Skandalis et al., 2021**).

En fait, la source de ce type de contamination se révèle parfois compliquer et difficile à expliquer. **Zhou et al., (2020)** rapportent sur l'application des antibiotiques dans la production animale et l'utilisation ultérieure du fumier de bétail; comme engrais organique dans la production de légumes, qui est une pratique courante, pour promouvoir la santé et la croissance des rendements du bétail et des légumes. Ce recyclage et l'utilisation ultérieure des effluents d'élevage, ainsi que des boues des stations d'épuration sont une alternative rentable aux engrais minéraux (**Zhou et al., 2020**). Cependant, ces engrais alternatifs sont considérés comme un réservoir de bactéries antibio-résistantes et de gènes de résistance aux antibiotiques (**Ding et al., 2019**), générant ainsi une voie de contamination des produits végétaux, comme la salade crue qui manque généralement de transformation (**Zhou et al., 2020**). En conséquence, la consommation humaine directe de légumes (non-cuits ou crus) pourrait conduire au transfert de bactéries résistantes aux antibiotiques et de leurs gènes de résistance, ce qui peut provoquer des infections bactériennes (**Manyi-Loh et al., 2018**). Les aliments peuvent également être contaminés à partir de l'environnement de leur

entreposage. Une telle contamination peut se produire après la transformation des aliments et est alors appelée “post-contamination”. Les aliments sont aussi susceptibles à une contamination par des bactéries résistantes aux antimicrobiens et/ou des gènes de résistance aux antimicrobiens provenant d'autres aliments, lors de la manipulation de l'aliment par le consommateur. C'est ce qui est appelé “la contamination croisée” (**Verraes et al., 2013**).

La conjugaison dans des matrices alimentaires a été signalée dans nombreuses études (**Verraes et al., 2013**). **Toomy et al. (2009)** ont démontré que des souches de bactéries lactiques (*Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus*) contenant des déterminants de résistance aux antibiotiques (plasmide ou transposon localisé) peuvent transférer ces marqueurs à d'autres bactéries lactiques dans des environnements naturels modélisés et dérivés de laboratoire. Par ailleurs, **Walsh et al. (2008)** ont rapporté sur le transfert de gènes de résistance à l'ampicilline d'origine plasmidique de *Salmonella typhimurium* DT104 à *E. coli* K12 dans du lait et du bœuf haché, et à des températures qui se produisent dans la transformation des aliments et la chaîne de distribution. Plus récemment, **Haubert et al. (2018)** ont trouvé qu'un isolat alimentaire de *L. monocytogenes* (Lm16) hébergeait un gène de résistance à la tétracycline à médiation plasmidique, le tetM, qui présentait une grande similarité et capacité d'échange avec celui d'*Enterococcus faecalis*, et cela *in vitro* et à la surface du fromage fondu.

1.2. Produits végétaux: Fruits et Légumes

Les produits frais sont populaires dans le monde entier, car ils sont reconnus comme une source importante de nutriments, de vitamines et de fibres pour l'homme (**Olaimat et Holley, 2012**). D'où la consommation de fruits et légumes est synonyme d'un mode de vie sain et d'ailleurs diverses organisations internationales, comme l'Organisation Mondiale de la Santé, encouragent la consommation quotidienne d'au moins 400g de fruits et légumes par jour (hors pommes de terre et autres tubercules féculents), pour la prévention des maladies chroniques, comme les maladies cardiaques, le cancer, le diabète, et l'obésité (**Callejón et al., 2015**).

Cependant, les fruits et légumes, et en particulier les légumes-feuilles consommés crus, sont de plus en plus reconnus comme des véhicules importants de transmission d'agents

pathogènes humains, traditionnellement associés aux aliments d'origine animale (**Berger et al., 2010; Alegbeleye et al., 2018**).

Salmonella spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp. et *Listeria monocytogenes* sont les agents pathogènes les plus connus dans la contamination des produits frais (**Wadamori et al., 2016**). D'autres bactéries comme *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp, *Shigella* spp, et *E. coli* entéro-pathogène ont aussi été rapportées impliquer. La plupart de ces agents pathogènes acquièrent des déterminants de la résistance aux antimicrobiens, en raison de la pression sélective exercée par les agents antimicrobiens (y compris les antibiotiques), au sein de l'agroécosystème et deviennent résistants à la plupart des options de traitement disponibles, ce qui aggrave encore les risques pour la santé humaine, environnementale et la sécurité alimentaire (**Iwu et Okoh, 2019**).

Chez l'homme, les infections d'origine alimentaire se manifestent par des symptômes allant de complications plus légères comme la diarrhée, les vomissements, les douleurs abdominales, la fièvre, les maux de tête et les douleurs musculaires à des problèmes de santé graves, comme l'intoxication aux entérotoxines (*E. coli* O157:H7 et *Shigella* spp) et les complications auto-immunes (*Enterobacter* spp), la septicémie, la colite hémorragique, et le syndrome hémolytique et urémique (SHU) (*E. coli* O157:H7), ainsi que les fausses couches chez les femmes enceintes (*Listeria monocytogenes*). Les pathogènes d'origine alimentaire n'ont pas de populations cibles, cependant, les groupes à risque principalement touchés par ces infections sont les femmes enceintes, les nourrissons, les personnes âgées, et les adultes immunodéprimés (**Yeni et al., 2016; Iwu et Okoh, 2019**).

Dans plusieurs régions du monde, de nombreuses épidémies d'infections d'origine alimentaire ont été associées à la consommation de fruits et légumes frais contaminés, tels que les épinards frais contaminés par *E. coli* O157:H7, en Amérique du nord, en 2006 (**Lynch et al., 2009**); la laitue et le concombre contaminés par *E. coli* O96 Enteroinvasive, en Grande-Bretagne, en 2014 et le melon rock contaminé par *Salmonella* *Hvittingfoss*, en Australie, en 2016 (**Wadamori et al., 2016**). Autres données plus récentes concernent la consommation de la papaye fraîche contaminée par *Salmonella* *Ouganda*, aux USA, en 2019 (**Iwu et Okoh, 2019**). Ces mêmes auteurs indiquent que les voies de contamination, ainsi que la fréquence de contamination des produits frais à la ferme varient généralement selon les lieux de culture, et cela est dû à différents facteurs environnementaux, tels que les

conditions climatiques, la topographie, les interactions avec l'utilisation des terres et la proximité des sites d'élevage d'animaux. En général, la principale origine des agents pathogènes entériques à la ferme provient des matières fécales humaines et animales (**Iwu et Okoh, 2019**). À vrai dire quelle que soit l'origine de la contamination des produits frais par des bactéries pathogènes, la préoccupation majeure demeure lorsque ces pathogènes sont porteurs de déterminants de résistance aux antibiotiques. Le fait que la plupart des antibiotiques ne sont pas entièrement métabolisés, mais rejetés dans l'environnement sous forme de déchets, la résistance aux antibiotiques a un impact écologique, car ces déchets ont toujours le potentiel d'influencer la population bactérienne et de promouvoir la résistance aux antibiotiques (**Manyi-Loh et al., 2018**).

1.2.1. Exemples de bactéries résistantes aux antibiotiques

i. Escherichia coli

Les *Escherichia coli* et en particulier les souches entérohémorragique (EHEC) ont été décrites comme des agents pathogènes de contamination des crudités et des légumes feuilles, et responsables d'épidémies d'origine alimentaire (**CDC, 2013; Faour-Klingbeil et al., 2016**).

Dans une étude réalisée par **Holvoet et al. (2013)** sur la contamination de la laitue ou son environnement de production (eau d'irrigation, sol) par *E. coli* antibio-résistante; il a été trouvé que sur 473 isolats d'*E. coli* retenus, 54 isolats (11,4%) étaient résistants à un ou plusieurs antibiotiques. Le taux de résistance le plus élevé a été observé pour l'ampicilline (7 %), suivis de la céphalothine, de l'amoxicilline-acide clavulanique, de la tétracycline, du triméthoprim et de la streptomycine, avec des taux de résistance compris entre 4,4 et 3,6 %. Toujours d'après la même étude ces isolats provenant de sites de production de laitue présentaient des profils de résistance comparables aux souches d'origine bovine. Ce qui a suggéré que les bovins peuvent être un réservoir potentiel de souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques dans la production primaire végétale. **Holvoet et al. (2013)** ont conclu que les légumes ne subissant aucun traitement d'inactivation ou de conservation lors de leur transformation, en particulier la laitue constituent un vecteur ou un réservoir de bactéries antibio-résistantes.

Dans une étude publiée par **Lima et al. (2017)**, un total de 486 échantillons d'aliments prêts-à-consommer ont été collectés dans des restaurants commerciaux (73), institutionnels (239)

et hôteliers (174) à Salvado, au Brésil. Les types d'échantillons comprenaient 101 céréales et légumes (y compris le riz, les pâtes et les céréales), 161 préparations à base de viande (y compris bovins, porcs, volaille et fruits de mer), 45 salades cuites (y compris, des légumes cuits occasionnellement avec de la mayonnaise ajoutée, des fruits, des céréales et du yaourt), 90 salades crues (dont crudités et fruits), 30 garnitures (dont légumes cuits avec adjonction de lait, fromage, œufs, céréales ou oléagineux), 20 soupes et sauces (à base de légumes cuits avec adjonction de viande, céréales, moutarde et mayonnaise), 25 desserts (dont tartes, gâteaux, et puddings surgelés) et 14 jus (à base de fruits et pulpes de fruits, eau et sucre). Les résultats ont révélé que les salades crues, les salades cuites et les jus représentent le taux le plus élevé d'échantillons, avec des NPP de coliformes thermotolérants impropres à la consommation humaine. En ce qui concerne la présence d'*E. coli*, 15 (3,0%) des échantillons d'aliments prêts-à-consommer se sont révélés contaminés. Les salades crues avaient le taux de contamination le plus élevé, 1,4% (n = 7), suivies des salades cuites, 0,8% (n = 4); des préparations à base de viande, 0,4% (n = 2); et des céréales et de légumineuses, 0,4% (n = 2). Par ailleurs, les profils de sensibilité des 15 isolats d'*E. coli* aux 15 antibiotiques ont révélé une résistance à neuf (60%) des antibiotiques testés. Les auteurs de cette étude signalent que les aliments prêts-à-consommer, en particulier les salades crues, peuvent être des réservoirs d'*E. coli* et faciliter ainsi la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques dans le microbiote gastro-intestinal de l'homme.

Aussi, **Song et al. (2020)** ont publié avoir isolé des *E. coli* productrices de β -lactamases à spectre étendu à partir de légumes crus en Corée du Sud.

Plus récemment, les travaux de **Mwanza et al. (2021)** sur la recherche d'*E. coli* O157:H7 dans diverses sources ont montré que sur 48 isolats d'*E. coli* incluant 20 (du fumier), 25 (des légumes) et 3 (des poissons) soumis à des tests de résistance aux antibiotiques, 25 (52,1%) ont présenté une résistance à au moins un antibiotique dont 11 du fumier, 13 des légumes et un du poisson. La résistance était plus fréquente à l'amoxicilline (35,4%), comparativement à la ciprofloxacine (2,1%). La présence de souches d'*E. coli* O157:H7 multi-résistantes a aussi été signalée dans l'eau d'irrigation et le sol agricole (**Iwu et al., 2021**).

ii. *Salmonella*

Au cours de la dernière décennie du 20^e siècle, *Salmonella* était la cause la plus fréquente de maladies bactériennes d'origine alimentaire représentant 5700 à 10200 cas, aux États-Unis

et en France (**Fung et al., 2018**). Elle est même considérée comme l'agent pathogène bactérien le plus courant responsable des épidémies de maladies d'origine alimentaire liées aux produits frais (**Fatica et Schneider, 2011; Pignata et al., 2017**).

Les espèces de *Salmonella* peuvent contaminer les produits frais, en particulier les légumes, à la fois pendant la phase de production par l'eau, le sol, les insectes ou d'autres animaux, contaminés par des matières fécales; et pendant la phase de préparation, par contamination croisée (équipements, surfaces, manipulateurs) (**Yeni et al., 2016**). L'apparition dans les aliments de souches de *Salmonella* spp., multi-résistantes aux antibiotiques utilisés dans le traitement de ses infections est déjà bien documentée (**de Jesús Cortés-Sánchez et al., 2017**). Bien avant de nombreuses études ont fait état sur la fréquence des *Salmonella* antibio-résistantes dans les aliments frais, notamment celle de **Yoke-Kqueen et al., (2008)** où des isolats de *S. enterica* récupérés à partir de légumes indigènes en Malaisie ont montré 100% (134/134) de résistance à l'érythromycine et 42%, 34% et 19% pour la tétracycline, la streptomycine et le triméthoprime-sulfaméthoxazole, respectivement.

Le serovar *S. Poona* résistant aux antibiotiques a provoqué une épidémie dans plusieurs États aux États-Unis impliquant 40 États, en raison de la consommation du concombre importé contaminé, entraînant 204 hospitalisations et six décès en 2015-2016. Parmi les isolats identifiés comme agents étiologiques, deux étaient résistants aux antibiotiques. Un isolat était résistant à la tétracycline et l'autre était résistant à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine (**CDC, 2016; Nair, 2018**).

Dans une étude effectuée par **na Phuket et al. (2019)**, 12,5% des isolats de *Salmoella* obtenus de légumes frais (Laitue, Persil, Cresson et Coriandre) étaient respectivement résistants aux sulfamides, à la tétracycline, à la gentamicine, à l'acide nalidixique et au sulfaméthoxazole à 20 %, 16 %, 12 %, 12 % et 12 %.

iii. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est un agent pathogène humain intracellulaire qui pénètre dans l'organisme par le biais d'aliments contaminés (**De Vasconcelos Byrne et al., 2016; Olaimat et al., 2018; Letchumanan et al., 2018**). Elle est connue pour contaminer les produits frais à feuilles, tels que les épinards, la laitue et la roquette. De la ferme à l'assiette, la chaîne d'approvisionnement des produits à feuilles fraîches est complexe et contient un large

éventail d'environnements où *L. monocytogenes* est sporadiquement détectée lors de l'échantillonnage de plusieurs sortes d'aliment (**Smith et al., 2018**). L'étude de **Chen** et ses collaborateurs en **2014** a été la première à explorer les sources potentielles de contamination de *L. monocytogenes* dans la chaîne de production de champignons, fournissant ainsi des informations de base pour l'adoption des mesures prophylactiques et des points de contrôle critiques pendant la production dans les plants de champignons, afin d'éviter la contamination par ce germe (**Chen et al., 2014**).

Listeria monocytogenes peut acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques à partir de plasmides et des transposons conjugatifs. Il a même été reporté que *L. monocytogenes* possède un génome fermé, cependant les interactions avec les donneurs potentiels sont entravées par l'antagonisme interspécifique, ce qui conduit à des augmentations occasionnelles de la taille des populations et donc de la possibilité d'acquérir une résistance aux antibiotiques (**Baquero et al., 2020**).

La présence de *L. monocytogenes* dans différentes sortes de légumes surgelés, tels que les haricots vert, les carottes, les artichauts et les épinards a aussi été signalée par **Mohamed et al., (2018)**; où les isolats testés étaient virulents, avec une résistance à plusieurs antibiotiques, entre autres l'amoxicilline, la gentamicine, la ciprofloxacine, l'acide clavulanique et l'amikacine.

Une étude antérieure réalisée dans la métropole de Zaria (Nigeria) a déterminé la présence et la résistance antimicrobienne de *L. monocytogenes* dans les salades de légumes prêtes-à-consommer. Les auteurs de cette étude précisent que les isolats testés positifs à la présence de *L. monocytogenes* sont tous résistants à au moins un antibiotique parmi les antibiotiques utilisés, avec une résistance élevée à l'ampicilline (92,9%) suivie de l'oxacilline (85,7%) (**Ieren et al., 2013**).

1.3. Produits animaux

Le potentiel de transmission de bactéries zoonotiques entériques résistantes aux antibiotiques des animaux aux humains est un problème de santé publique depuis plusieurs décennies. Les bactéries porteuses de gènes de résistance aux antibiotiques présentes dans le tractus intestinal des animaux destinés à l'alimentation peuvent contaminer les carcasses et provoquer des maladies d'origine alimentaire chez l'homme qui peuvent ne pas répondre au traitement antibiotique. Il est donc important de surveiller les changements dans la

sensibilité antimicrobienne des organismes zoonotiques et commensaux **(de Jong et al., 2011)**.

La pertinence de l'utilisation agricole des antibiotiques pour la santé humaine est soulignée par le fait que 62 % des 34,3 millions de livres d'antibiotiques vendus ou distribués pour être utilisés dans la production d'animaux destinés à l'alimentation aux États-Unis en 2015 ont été considérés comme « médicalement importants » pour la santé humaine **(FDA, 2016; Davis et al., 2018)**.

Les populations humaines et animales sont exposées à un risque de transmission croisée de bactéries zoonotiques par contact direct, en raison de la proximité avec les animaux destinés à l'alimentation, les animaux de compagnie, les marchés d'animaux sauvages vivants, la contamination de l'environnement et la consommation d'aliments d'origine animale contaminés. La situation devient plus compliquée, en raison de la transmission croisée des déterminants de la résistance aux antibiotiques avec l'infection. Chez l'homme, la prescription excessive d'antibiotiques est la principale source de sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques, mais leur utilisation chez les animaux destinés à l'alimentation en plus, du pool génétique de résistance environnementale « resistome » joue également un rôle important dans cet état multifactoriel complexe **(Bandyopadhyay et Indranil, 2020)**. Chez les animaux destinés à l'alimentation, l'utilisation des antibiotiques dans la thérapie, la prophylaxie, la métaphylaxie et la promotion de la croissance est importante et difficile à arrêter **(Bandyopadhyay et Indranil., 2020)**. Cette utilisation sauve non seulement la vie de l'animal, mais diminue également la charge zoonotique de pathogènes dans l'environnement et réduit la production de méthane par le bétail (comme dans le cas du monesin, un antibiotique qui réduit de 7%, la production de CH₄) **(Odongo et al., 2007; Knapp et al., 2014)**.

La fréquence des bactéries antibio-résistantes dans les aliments d'origine animale est de plus en plus signalée. Par exemple, **Puig-Peña et al., (2020)**, en analysant une large gamme de produits alimentaires, incluant parmi d'autres, du lait et des produits laitiers, des œufs et produits dérivés et des viandes et des produits carnés ont signalé que de toutes les bactéries récupérées, la résistance aux antibiotiques a été observée dans 32,3% des isolats de *Salmonella*, 30,1% d'*E. coli*, 29,9% des *Staphylococcus* et 8,6% des *Vibrio cholerae*. Ils rapportent aussi que les germes résistants ont été le plus souvent identifiés à partir des viandes et des produits carnés, avec une prédominance des isolats de *Salmonella* et d'*E. coli*.

1.3.1. Exemples de bactéries résistantes aux antibiotiques

i. Salmonella

Comme mentionné plus haut, l'espèce *Salmonella* est l'un des agents pathogènes d'origine alimentaire les plus importants dans le monde (**Chen et al., 2020**), et reste la principale cause de gastro-entérite infectieuse due à la consommation d'aliments d'origine animale, principalement des produits avicoles, tels que les œufs et le poulet (**Braden, 2006; Elkenany et al., 2019; Vergas et al., 2020**).

La revue de **Castro-Vergas et al. (2020)**, traitant de la prévalence mondiale, des sérotypes et des profils de résistance aux antibiotiques d'isolats de *Salmonella* provenant de différents segments de la chaîne de production avicole ont indiqué que le sérotype le plus courant était *S. enteritidis*, suivi par *S. typhimurium*. Les niveaux de résistance les plus élevés ont été trouvés pour l'acide nalidixique et l'ampicilline.

Une autre étude visant la prévalence de *Salmonella spp.*, *S. enteritidis* et *S. typhimurium* dans du bœuf vendu en détail dans différents marchés de la région de Selangor en Malaisie a démontré la présence de huit sérovars différents, avec une prédominance du sérotype *S. Agona*. Tous ces isolats étaient résistants à la pénicilline, à l'érythromycine et à la vancomycine. Les chercheurs soulignent aussi leur résistance à au moins trois antibiotiques. Par contre, les isolats de *S. typhimurium* présentaient une résistance élevée et multiple à plusieurs antibiotiques (**Thung et al., 2018**).

Au Bangladesh, la *Salmonella* est une menace d'origine alimentaire bien connue dans ce pays caractérisé d'un climat de type tropical, et dont l'étude de **Hassan et al. (2018)** a révélé une prévalence relativement plus élevée de *Salmonella*, parmi les aliments de rue, en particuliers les aliments traditionnels à base d'œufs et de lait comme "**Fuska**" et "**Borhani**", respectivement. Les résultats de cette étude ont indiqué que les isolats de *Salmonella* provenant de la plupart des échantillons d'aliments étaient multi-résistants à la plupart des antibiotiques testés (*i.e.* Ampicilline, Amoxicilline, Ciprofloxacine, Enrofloxacine, Péfloxacine, Sulfate de Colistine, Oxytétracycline, Tétracycline, Azithromycine, Erythromycine, Ceftriaxone).

ii. Escherichia coli

Cette espèce à Gram négatif classée dans la famille des entérobactéries et qui réside généralement dans les intestins des animaux à sang chaud est soumise à de fréquentes

rencontres avec des antibiotiques, ce qui lui confère une pression de sélection élevée conduisant à une résistance aux antibiotiques consommés par son hôte (**Looft et al. 2012; Jang et al., 2017**). Par ailleurs, en raison de la large diffusion des matières fécales humaines et animales dans l'environnement, les bactéries et notamment, *E. coli* ont le potentiel d'être présentes dans les zones utilisées pour la production alimentaire. Par exemple, *E. coli* peut être trouvée dans le fumier animal et les eaux usées (jusqu'à ce qu'ils soient entièrement compostés), les fermes et les zones périurbaines (**FAO, 2011**).

De nombreux travaux, parmi d'autres ceux de **Ayoyi et al., 2008; Arathy et al., 2011; Rahman et al., 2017 et Li et al., 2020**, ont en effet démontré la présence d'*E. coli* antibiotique-résistante dans les aliments d'origine animale. **De Campos et al. (2017)** ont signalé que des fromages au lait cru, collectés dans les différentes régions du Brésil étaient contaminés par *E. coli*, et dont la résistance aux antibiotiques a été détectée dans certains isolats, avec les pourcentages suivants: tétracycline (25,6%), suivie de l'ampicilline (17,9%), de la céfoxitine (7,7%), de l'acide nalidixique (5,1%) et de l'amoxicilline-acide clavulanique (2,6%). Les fromages au lait cru étant très consommés, la présence de ces microorganismes est un risque potentiel qu'il convient de surveiller fréquemment ont indiqué ces auteurs.

Les résultats d'une étude réalisée chez les troupeaux de poulets de chair conventionnels et biologiques ont montré que les *E. coli* isolées de poulets produits de manière conventionnelle étaient significativement plus résistantes à la néomycine et à la tétracycline, par rapport aux poulets produits biologiquement dans les échantillons de la collection du mois de juillet et aucune différence significative n'a été observée entre les groupes dans les échantillons du mois de septembre (**Kim et al., 2021**).

iii. *Vibrio*

Le genre *Vibrio* comprend des bactéries halophiles, en forme de bâtonnets à Gram-négatif, préférant les niches écologiques estuariennes et les zones côtières. Les espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* représentent une menace considérable pour la santé publique, en tant qu'agents d'infections alimentaires sporadiques et épidémiques associés à la consommation de poisson ou de crustacés contaminés crus ou insuffisamment cuits (**Schärer et al., 2011; Elbashir et al., 2018**).

Tout comme chez de nombreux genres bactériens la résistance aux antibiotiques est apparue et a évolué chez les *Vibrio* au cours des dernières décennies, en raison de

l'utilisation excessive et de la mauvaise utilisation des antibiotiques dans les systèmes humains, agricoles et aquacoles (Das et al., 2020; Dutta et al., 2021). La revue de Dutta et al., (2021) a indiqué que plusieurs études ont signalé que les isolats de *V. vulnificus* sont devenus résistants à plusieurs antibiotiques comme l'ampicilline, la tétracycline, l'aztréonam, la streptomycine, la gentamicine et la tobramycine. Par exemple, l'étude de Pan et al., (2012) portée sur la caractérisation moléculaire et la sensibilité aux antibiotiques de *V. vulnificus* isolé des crevettes vendues au détail à Hangzhou, en république populaire de Chine a montré que certaines souches ont exhibé une résistance ou une résistance intermédiaire au céfépime (3,03%), à la tétracycline (6,06%), à l'aztréonam (24,24%), à la streptomycine (45,45%), à la gentamicine (93,94%), à la tobramycine (100%) et à la céfazoline (100%).

En France, 384 isolats de *V. parahaemolyticus* provenant de différents produits de la pêche et de l'aquaculture ont été criblés, pour leur résistance aux antibiotiques. La résistance la plus fréquemment détectée a été pour la tétracycline (56 souches) et 2,5 % de la collection ont été résistants à au moins trois classes différentes d'antibiotique. Un isolat de crevettes importées était résistant à neuf antibiotiques et portait le gène bla_{NDM-1} (New Delhi metalloβ-lactamase-1) conférant une résistance aux carbapénèmes, qui font partie des antibiotiques d'importance critique pour la médecine humaine (Briet et al, 2018; Brisabois et al., 2019).

Dans une étude effectuée sur 905 échantillons d'aliments (aliments prêts-à-consommer: poisson et crevettes) provenant de 15 provinces de Chine, un total de 202 isolats de *V. parahaemolyticus* a été retenu et soumis à un test de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme). Les isolats étaient pour la plupart résistants à l'ampicilline et présentaient des taux de résistance relativement élevés de 74,75 %, 65,84 %, 58,91 % et 44,55 %, à la céphalothine, à la streptomycine, à la céfazoline et à la kanamycine, respectivement (Li et al., 2020).

Une autre étude menée en Corée sur l'évaluation de l'occurrence, des déterminants de la virulence et des profils de sensibilité aux antibiotiques de *Vibrio spp.* isolé de la palourde japonaise vivante (*Ruditapes philippinarum*) a montré que tous les isolats étaient résistants à au moins deux antibiotiques. Le taux de résistance maximum a été observé pour l'ampicilline (100%) suivi de la pipéracilline (81%), de la rifampicine (77%), du sulfate de colistine (71%) et de la céphalothine (68%) (Dahanayake et al., 2020).

Présentation d'articles scientifiques

Article 1: Ready-to-Eat Dairy Products as a Source of Multidrug-Resistant *Enterococcus* Strains: Phenotypic and Genotypic Characteristics. Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., García-Solache M., 2020. Journal of Dairy Science 5(103): 4068-4077.

Article disponible sur: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(20\)30206-X/](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(20)30206-X/)

Description de l'étude

Cette étude est basée sur la caractérisation des *Enterococcus* spp isolés à partir de produits laitiers fermentés prêts-à-consommer en Pologne, ainsi que leurs profils génétiques de résistances aux antibiotiques, réalisée par Chajęcka-Wierzchowska et ses associés et publiée en 2020 dans *Journal of Dairy Science*.

Justification du choix de l'article

L'article a été choisi pour deux raisons bien précises, la première étant le but de la recherche qui se rapproche beaucoup du thème du présent mémoire, et la seconde, concerne les diverses méthodes adoptées, afin de réaliser la partie expérimentale de cet article reste très informatif du point de vue palliasse (Matériels utilisés et méthodes suivies).

1. Résumé

Cette étude a révélé que les *entérocoques* sont largement présents dans les produits laitiers prêts-à-consommer vendus au détail en Pologne. De nombreuses souches isolées sont résistantes aux antibiotiques et portent des gènes de résistance transférables, ce qui induit une transmission de bactéries multi résistantes à l'homme, sachant que les *entérocoques* sont des bactéries ubiquitaires capables de coloniser le tractus gastro-intestinal humain et animal et les produits alimentaires frais et fermentés. Les auteurs ont démontré que le génome des *Enterococcus* spp possède une haute plasticité pour acquérir une résistance à plusieurs antibiotiques, et les infections causées par ces organismes seront difficile à traiter, ce qui explique la résistance aux antibiotiques des *entérocoques* d'origine alimentaire. Le but de ce travail était de caractériser les *Enterococcus* spp dans les produits laitiers fermentés de Pologne et leur capacité à devenir résistants aux antibiotiques. Au total, 189 souches ont été isolées de 182 produits laitiers sur 320 échantillons testés. Les espèces prédominantes étaient *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*. Les isolats étaient résistants à la

streptomycine, à l'érythromycine, à la tétracycline, à la rifampicine et à la tigécycline. Deux souches résistantes à la vancomycine et 3 souches résistantes au linézolide ont été détectées. Différentes souches ont présenté une résistance aux aminosides de haut niveau, ainsi à la tétracycline et aux macrolides. 96,3% des souches résistantes à la tétracycline possédaient un élément génétique mobile conjugatif dans 96,3%, et 15,3% dans les souches normales.

2. Introduction et objectifs

L'introduction de cet article a décrit tous les aspects du genre *Enterococcus*, à savoir: écologiques, microbiologiques, technologiques et pathogénicité (incluant la résistance aux antibiotiques). Cette synthèse bibliographique sera présentée telle que publiée par les auteurs.

Les entérocoques sont des germes ubiquitaires colonisant différentes niches. Ce sont des commensaux du tractus gastro-intestinal des animaux, capables d'atteindre le lait cru et la viande, via la contamination fécale (**Ben Braïek et Smaoui, 2019**). La nature très répandue des *Enterococcus* spp dans les aliments prêts à consommer peut être attribuée à leur résistance aux opérations de transformation et de stockage des aliments, ainsi qu'à leur remarquable capacité d'adaptation. Ces micro-organismes constituent fréquemment la microflore résiduelle des aliments. Lors de la fabrication du fromage, les facteurs de pasteurisation du lait jouent un rôle clé dans la sélection microbienne. Selon les estimations, plus de 50% des populations d'*Enterococcus* spp survivent à une pasteurisation haute température/temps court (72°C/15s), et certaines populations sont indemnes des températures de traitement plus élevées (85°C/16s; Ziarno, 2006). Les bactéries du genre *Enterococcus* sont omniprésentes dans les fromages: cottage et coagulés à la présure, qui sont à base de lait cru et pasteurisé (**Giraffa et al., 1997; Andrighetto et al., 2001; Gelsomino et al., 2001; Citak et al., 2004; Schirru et al., 2012**). Les entérocoques sont caractérisés par des niveaux d'activités protéolytique et lipolytique plus élevés que les autres bactéries lactiques, et ils sont également capables de décomposer les citrates en acétaldéhyde, acétoïne et diacétyle, qui jouent un rôle important dans l'affinage de certains types de fromages (**Manolopoulou et al., 2003**). De ce fait, les entérocoques améliorent les attributs sensoriels du fromage, et ils sont inclus dans les cultures starters pour la production de divers fromages, en particulier les fromages italiens, argentins et grecs (**Giraffa, 2003**).

L'abondance des entérocoques dans le fromage est déterminée par les dénombrements dans le lait, la pureté de la culture starters et les normes d'hygiène dans l'usine de transformation (**Ziarno, 2006**). La présence d'entérocoques dans le lait peut résulter d'une contamination directe par des excréments d'animaux ou d'une contamination indirecte par de l'eau ou des impuretés provenant du matériel de traite (**Bulajić et al., 2015**). Les dénombrements des *Enterococcus* spp. dans le caillé-frais du fromage coagulé à la présure vont de 10^3 à 10^6 cfu/g, et les nombres fluctuent au cours du processus de fabrication du fromage, en fonction de la résistance bactérienne au pH et au sel (**Pluta et al., 2004**).

Les entérocoques sont les plus abondants dans les fromages au lait cru, en particulier dans les fromages artisanaux produits dans le sud de l'Europe. Dans ces types de produits, les entérocoques sont considérés comme des bactéries lactiques non starter (**Giraffa, 2003**). Le fromage au lait cru n'est pas produit industriellement en Pologne. La présence d'*Enterococcus* spp dans les fromages au lait pasteurisé est attribuée à leur résistance thermique ou à leur re-contamination après pasteurisation (**Giraffa, 2002**).

Les entérocoques peuvent également être pathogènes pour l'homme. La résistance aux antibiotiques au sein du genre *Enterococcus* n'a cessé d'augmenter ces dernières années (**Asadollahi et al., 2018**). Les souches les plus virulentes et multi-résistantes sont encore isolées des hôpitaux, mais des entérocoques multi-résistants sont de plus en plus identifiés dans les aliments (**Kim et al., 2018, 2019**). Des entérocoques résistants aux antibiotiques ont également été isolés des aliments prêts à consommer qui ne sont pas traités thermiquement avant consommation, en suscitant des inquiétudes (**Chajęcka -Wierzchowska et al., 2016a**). La viande et les produits carnés sont les sources les plus courantes d'entérocoques multi-résistants, mais de telles souches ont également été trouvées dans les produits laitiers (**Silveti et al., 2019**). Les entérocoques consommés avec du fromage pourraient s'établir dans l'intestin, même si leur nombre dans le fromage est faible (**Gelsomino et al., 2003**).

Les entérocoques ont développé de nombreuses stratégies adaptatives, et ils peuvent coloniser temporairement ou définitivement le tractus gastro-intestinal, en augmentant ainsi le risque de transfert de gènes bactériens vers le microbiote intestinal. Le transfert du gène de résistance *vanA* d'un isolat d'*Enterococcus faecium* d'origine animale à un isolat d'*E. faecium* d'origine humaine dans les intestins de volontaires humains a été rapporté (**Lester et al., 2006**). Cela suggère qu'un nombre élevé d'entérocoques d'origine alimentaire capables de transmettre des gènes de résistance pourrait servir de réservoir pour le

transfert de résistance à d'autres populations d'entérocoques, avec des effets sur la santé humaine. Les entérocoques associés aux aliments peuvent survivre au passage gastrique et se multiplier, entraînant un portage intestinal soutenu (Sørensen et al., 2001). Au vu de tout cela, le but de cette étude était d'évaluer la résistance aux antibiotiques et les déterminants génétiques chez des souches d'*Enterococcus* spp. isolées de produits laitiers prêts à consommer et achetés, en Pologne.

3. Matériel et Méthodes

3.1. Échantillonnage

Dans cette étude, des échantillons ont été sélectionnés selon plusieurs catégories: fromage présure à pâte molle, fromage présure mi-dur, fromage présure dur, fromage au lait caillé, et autres produits laitiers (lait concentré, lait en poudre, crème sure, beurre). Le nombre d'échantillons dépendait de l'assortiment du magasin. Les échantillons provenaient de 11 supermarchés, marchés et magasins locaux de la ville d'Olsztyn. Au total 320 échantillons de produits laitiers prêts à consommer ont été étudiés, dont 75 fromages à présure-pâte molle, 46 fromages à présure-mi dure, 91 fromages à pâte dure, 88 fromages au lait aigre (non affiné, vieilli) et 20 autres produits laitiers. Les échantillons ont été amenés au laboratoire en chaîne de froid et analysés pour la présence d'*Enterococcus* spp le même jour.

3.2. Isolement et identification présomptive d'*Enterococcus* spp

De chaque produit laitier, 25g d'échantillon pendant 2 min dans un stomacal (BagMixer 400P, Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France), avec 225 mL d'eau peptonée tamponnée et incubés une nuit à 37°C. Après cela, une anse a été striée sur gélose Slanetz et Bartley (Merck, Darmstadt, Allemagne). Ensuite, 1 ou 2 colonies par échantillon, avec une morphologie typique des entérocoques ont été sélectionnées. Comme aucun des échantillons n'avait plus de 2 colonies morphologiquement différentes, 1 ou 2 ont été prélevées pour une analyse plus approfondie. L'identification présomptive des isolats a été effectuée comme décrit précédemment (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2016a, Chajęcka-Wierzchowska et al., 2016b), en utilisant la coloration de Gram, production de catalase et d'oxydase, croissance à 10°C et 45°C, croissance en présence de 6,5% NaCl, croissance à pH 9,6, et croissance et hydrolyse de l'esculine sur gélose bile-esculine (Merck). Les isolats d'entérocoques ont été déposés dans la collection de cultures du laboratoire du

Département de microbiologie industrielle et alimentaire, Université de Warmie et Mazurie (**Olsztyn, Pologne**) et ont été conservés dans une micro banque à -80°C (Biocorp, Varsovie, Pologne).

3.3. Identification par PCR des souches d'*Enterococcus spp.*

L'identification des espèces a été réalisée, en utilisant des amorces de PCR et les conditions précédemment décrites pour *Enterococcus* espèces *faecium*, *faecalis*, *casseliflavus*, *gallinarum*, *durans*, et *hirae* (**Dutka-Malen et al., 1995; Deasy et al., 2000; Kariyama et al., 2000; Knijff et al., 2001**). L'extraction de l'ADN a été effectuée selon une méthodologie précédemment décrite dans (**Chajęcka-Wierzchowska et al., 2014; Chajęcka-Wierzchowska et al., 2016a; Chajęcka-Wierzchowska et al., 2016b**). En résumé, les souches bactériennes ont été étalées sur de la gélose cœur-cerveille infusion (Merck) et incubées pendant une nuit à 37°C. Les colonies ont été remises en suspension dans un tampon Tris-EDTA (Sigma Aldrich, Poznan, Pologne) et ont été lysées par du lysozyme (0,6 mg/mL; A&A Biotechnology, Gdynia, Pologne). L'ADN génomique total des souches a été extrait à l'aide du Kit Genomic Mini DNA Purification (A&A Biotechnology), selon les instructions du fabricant. Toutes les réactions de PCR ont été analysées par électrophorèse à travers un gel d'agarose haute résolution à 1,5% (Promega, Madison, WI) dans un tampon 1×TBE, pH 8,3. Les tailles des produits d'amplification ont été estimées, par comparaison avec un marqueur de taille moléculaire de 100 pb (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Varsovie, Pologne), colorés avec du bromure d'éthidium (Sigma Aldrich). Les gels sont visualisés sous lumière UV à l'aide d'un système G-BOX F3 (Syngene, Bangalore, Inde) et d'un logiciel Gene Tools (Syngene). Chaque profil a été comparé visuellement à celui obtenu à partir des souches d'entérocoques de référence: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 19434, *E. casseliflavus* ATCC 49605, *E. gallinarum* ATCC 700425, *E. durans* ATCC 49479 et *E. hirae* ATCC 8043.

3.4. Test de sensibilité aux antibiotiques

Les profils de sensibilité ont été déterminés par la méthode de diffusion sur disque sur gélose Mueller-Hinton (Merck), conformément aux directives du Clinical Laboratory Standards Institute (**CLSI (Institut des normes cliniques et de laboratoire), 2017**), d'après (**Chajęcka-Wierzchowska et al., 2016; Chajęcka-Wierzchowska et al., 2016**). Dix-huit antibiotiques ont été utilisés. Une culture d'une nuit d'isolats d'entérocoques a été striée à la

surface de la gélose Mueller-Hinton, puis des disques d'antibiotiques ont ensuite été placés sur la gélose et incubés à 37°C. Les diamètres des zones ont été enregistrés, après une période d'incubation de 24 heures. Les souches d'entérocoques étudiées ont été classées comme résistantes ou sensibles selon les critères de **CLSI, (2017)** et de **EUCAST (Comité européen des tests de sensibilité aux antimicrobiens), 2019**, pour la tigécycline. Comme contrôle de qualité la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été utilisée, et pour les souches résistantes à la vancomycine, la CMI a été définie. Le E-test commercial (bioMérieux, Craponne, France) a été utilisé, selon les instructions du fabricant.

3.5. Analyse des mécanismes moléculaires de la résistance aux antibiotiques

Tous les isolats ont été testés pour la présence des gènes de résistance à la tétracycline codant pour les protéines d'efflux (*tetK* et *tetL*) et des gènes codant pour les protéines de protection ribosomique (*tetM*). L'amplification du gène d'efflux de la tétracycline *tetK* a été réalisée selon le protocole de **Gevers et al. (2003)** et celle de *tetW*, selon le protocole décrit par **Aminov et al. (2001)**. Les gènes de résistance à la tétracycline *tetM* et *tetL* et celui des macrolides *ermB* ont été détectés par PCR multiplex (triplex), en utilisant les amorces et les conditions spécifiques rapportées par **Rizzotti et al. (2009)**.

... La présence de transposons conjugatifs des familles Tn916 et Tn1545 a été déterminée à l'aide d'amorces ciblant le gène *int* de l'intégrase, selon **Macovei et Zurek (2006)**. Les gènes *ermA*, *ermC*, *mefA* et *E*, et *mrsC* ont été détectés selon **Sutcliffe et al. (1996)**. La PCR multiplex a été utilisée pour détecter les 4 gènes suivants codant pour les enzymes modifiant les aminosides : *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3'')-IIIa*, *ant(4')-Ia* et *ant(6')-Ia*. Ces gènes ont été contrôlés selon les protocoles fournis par **Vakulenko et al. (2003)** et **Kobayashi et al. (2001)**. Pour finir, la détection des gènes *vanA*, *vanB*, *vacC1*, et *vanC2* et *C* a été effectuée selon le protocole proposé par **Dutka-Malen et al., (1995)**.

4. Résultat

Sur 320 échantillons de produits laitiers, 182 étaient contaminés par des entérocoques et 189 souches ont été isolées. D'après les auteurs les espèces prédominantes étaient *E. faecium* (53,4 %) et *E. faecalis* (34,4%). Les produits analysés étaient caractérisés par de faibles numérations d'*E. gallinarum* (6,3%) et d'*E. casseliflavus* (2,5%), alors que *E. durans* et *E. hirae* n'ont pas été détectés (**Tableau I**).

Tableau I: Occurrence des espèces d'*Enterococcus* dans les échantillons d'aliments laitiers (n = 320).

Espèces	Nombre (%) d'isolat	% d'échantillons positifs
<i>Enterococcus faecalis</i>	65 (34.4)	20.3
<i>Enterococcus faecium</i>	101(53.4)	31.6
<i>Enterococcus gallinarum</i>	12 (6.3)	3.8
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	5 (2.5)	1.6
D'autres <i>Enterococcus</i> spp	6 (3.2)	1.9
Total	189	59.2

Parmi les souches d'*Enterococcus* analysées, les pourcentages de résistance les plus élevés sont survenus, en réponse à la streptomycine (29,1%), à l'érythromycine (14,3%), à la tétracycline (11,6%), à la rifampicine (8,7%) et à la tigécycline (8,1%). Le pourcentage de souches résistantes aux antibiotiques restants était de 3,2 à 1,1%, et aucune n'était résistante à l'ampicilline, à la teicoplanine ou à la ciprofloxacine. Seulement 2 souches d'*E. faecalis* étaient résistantes à la vancomycine, un médicament de dernier recours contre les infections graves des bactéries à Gram positif (CMI>256mg/mL). Cependant, aucun gène vanA ou vanB n'a été identifié. Par contre, *E. casseliflavus* et *E. gallinarum* se sont montrés résistants à la vancomycine et les auteurs ont noté que ceci était une résistance bactérienne naturelle due à la présence des gènes vanC1 et vanC2 ou C3. Ainsi, l'identification de 26 (13,75%) souches multi-résistantes et 23 phénotypes différents multi-résistants a été effectuée, dont S, TE, TGC et E étaient les plus courants. L'observation de phénotype multi-résistant pour *E. faecalis* et *E. faecium*, et d'autre entérocoques a été établie, ainsi que 3 isolats d'*E. faecalis* étaient résistants au linézolide (**Tableau II, Tableau III**).

Tableau II: Nombre (%) de souches d'entérocoques résistantes aux antibiotiques isolées à partir d'échantillons des produits laitiers.

ATB	Souches					Total n = 189
	<i>Enterococcus faecalis</i> n = 65	<i>Enterococcus faecium</i> n = 101	<i>Enterococcus gallinarum</i> n = 12	<i>Enterococcus casseliflavus</i> n = 5	Autre <i>Enterococcus spp.</i> n = 6	
AMP	0	0	0	0	0	0
P	2(3.1)	0	0	0	0	2(1.1)
CN	0	3(3.0)	0	0	0	3(1.6)
S	24(36.9)	30(27.9)	0	0	0	55(29.1)
VA	2(3.1)	0	0	0	0	2(1.1)
TEC	0	0	0	0	0	0
NOR	0	4(4.0)	0	0	0	4(2.1)
LEV	2(3.1)	0	0	0	0	2(1.1)
CIP	0	0	0	0	0	0
TE	11(16.9)	11(10.9)	0	0	0	22(11.6)
TGC	9(13.8)	3(3.0)	2(16.7)	1(28.0)	1(16.7)	15(8.1)
RD	5(7.7)	7(6.9)	3(25.0)	1(28.0)	2(33.3)	16(8.7)
F	5(7.7)	1(1.0)	0	0	0	6(3.2)
LZD	3(4.6)	0	0	0	0	3(1.6)
FOT	2(3.1)	3(3.0)	0	1(28.0)	0	6(3.2)
C	4(6.2)	0	0	0	0	4(2.1)
QD	Nc ¹	3(3.0)	0	1(28.0)	0	4(2.1)
E	12(18.5)	15(14.9)	0	0	0	27(14.3)

Les souches d'*Enterococcus faecalis* sont intrinsèquement résistantes à la quinopristine et à la dalfopristine. ATB: Antibiotique, AMP = ampicilline, P = pénicilline G, CN = gentamicine, S = streptomycine, VA = vancomycine, TEC = teicoplanine, NOR = norfloxacine, LEV = lévofloxacine, CIP = ciprofloxacine, TE = tracycline, TGC = tigécycline, RD = rifampicine, F = nitrofurantoïne, LZD = linézolide, FOT = fosfomycine, C = chloramphénicol, QD = quinupristine-dalfopristine, E = érythromycine. nc = non vérifié.

Tableau III: Gènes de résistance aux antibiotiques isolés des produits laitiers (% entre parenthèses).

Gènes	Souche					
	<i>Enterococcus faecalis</i> n = 65	<i>Enterococcus faecium</i> n = 101	<i>Enterococcus gallinarum</i> n = 12	<i>Enterococcus casseliflavus</i> n = 5	Autres <i>Enterococcus</i> spp. n = 6	Total n = 189
Aminoglycosides						
aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia	7(10.8)	14(13.9)	0	0	0	21(11.1)
aph(2'')-Ib	0	0	0	0	0	0
aph(2'')-Ic	0	0	0	0	0	0
aph(2'')-Id	0	0	0	0	0	0
aph(3'')-IIIa	12(18.5)	19(18.8)	0	0	0	32(16.4)
ant(4')-Ia	2(3.1)	0	0	0	0	2(1.1)
ant(6')-Ia	19(29.2)	26(25.7)	0	0	0	45(23.8)
Tetracyclines						
tetM	15(23.1)	10(9.9)	2(16.7)	0	0	27(14.3)
tetL	8(12.3)	7(6.9)	2(16.7)	1(20.0)	1(16.7)	19.10.1
tetK	2(3.1)	0	0	0	0	2(1.1)
tetO	0	0	0	0	0	0
tetW	0	0	0	0	(16.7)	1(0.5)
Macrolides						
ermA	4(6.2)	6(5.9)	0	0	0	10(5.5)
ermB	12(8.5)	12(11.9)	0	0	0	24(12.4)
ermC	0	1(1.0)	0	0	0	1(0.5)
msrC	2(3.1)	1(1.0)	0	0	0	3(1.6)
MefA/E	0	2(2.0)	0	0	0	2(1.1)
Glikopeptides						
vanA	0	0	0	0	0	0
vanB	0	0	0	0	0	0
vanC1	0	0	12(100)	0	0	12(6.3)
vanC2/C3	0	0	0	5(100)	0	5(2.6)
Transposon						
int (Tn916–Tn1545)	15(23.1)	12(11.9)	2(0.2)	0	0	29(15.3)

Tableau IV: Phénotypes présents dans les souches résistantes à des concentrations élevées d'aminosides¹.

Espèces	HLAR	Nombre (%) de souches		
		HLGR	HLSR	HLGR + HLSR
<i>Enterococcus faecalis</i>	24	0	24(100)	0
<i>Enterococcus faecium</i>	33	0	30(90.9)	3(9.1) 3
Total	57	0	54	3

¹**HLAR** = résistance élevée aux aminosides; **HLGR** = résistance élevée à la gentamycine; **HLSR** = résistance élevée à la streptomycine.

Les souches résistantes à la streptomycine possèdent le plus souvent le gène ant(6')-Ia, qui pourrait être localisé sur un transposon (Clark et al., 1999), et qui a été détecté individuellement ou en association avec le gène aph(3'')-IIIa codant pour une résistance de bas niveau à la kanamycine ou avec le gène aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia codant pour HLGR (Tableau V).

Tableau V: Profils de gènes codant pour les enzymes aminosides (AME) dans des souches résistantes à des concentrations élevées de streptomycine [phénotype de résistance élevée à la streptomycine (HLSR)].

Espèce	Nombre de souches HSLR	Génotype	Nombre (%) de souche
<i>Enterococcus faecalis</i>	24	ant(6')-Ia	10(42.0)
		aph(3'')-IIIa + anti(6')-Ia	7(29.0)
		aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia + aph(3'')-IIIa	3(13.0)
		aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia + ant(6')-Ia	2(8.0)
		aph(3'')-IIIa + ant(4')-Ia	2(8.0)
<i>Enterococcus faecium</i>	30	aph(3'')-IIIa + ant(6')-Ia	15(50.5)
		ant(6')-Ia	6(20.0)
		aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia + ant(6')-Ia	5(17.0)
		aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia + aph(3'')-IIIa	4(13.0)

La détection de la résistance aux tétracyclines était le plus souvent conférée par les gènes tetM et tetL. Le gène tetK a été identifié dans seulement 2 isolats d'*E. faecalis* et le gène tetW dans seulement 1 isolat d'*Enterococcus spp.* Les transposons de la famille Tn 916/Tn 1545 ont été détectés dans 26 des 27 souches (96,3%) possédant le gène tetM. Le groupe de souches présentant une résistance phénotypique aux tétracyclines était caractérisé par une plus grande diversité d'espèces que les isolats résistants à l'érythromycine (tableau VI, tableau VII). La résistance aux tétracyclines chez *E. faecalis* était associée à la présence du gène tetM (tableau IV). Dans les souches d'*E. faecium*, la résistance à la tétracycline était associée à la présence d'un seul gène tetM ou d'une combinaison des gènes tetM et tetL (tableau VI). La présence du gène tetL ou d'une combinaison des gènes tetM et tetL a également été observée chez d'autres souches d'entérocoques (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum* et autres *Enterococcus spp.*). Quant à la présence du gène tetK s'accompagnait généralement de l'amplification du gène tetM. Dans le groupe des 2 souches d'*E. gallinarum*

caractérisé par une résistance phénotypique aux tétracyclines, la présence du génotype tetM et tetL a été observé (**tableau VI**).

Tableau VI: Diversité génotypique des souches d'entérocoques résistantes à la tétracycline (TETR).

Espèces	Nombre de souches TETR	Gènes de résistance aux antibiotiques	Nombre (%) de souches
<i>Enterococcus faecalis</i>	24	tetM	11(45.8)
		tetM+tetL	6(25.8)
		tetM	3(12.5)
		tetM+tetK	2(8.3)
		Aucun	2(8.3)
<i>Enterococcus faecium</i>	14	tetM	5(17.7)
		tetM+tetL	5(17.7)
		tetL	2(7.7)
		Aucun	2(7.7)
<i>Enterococcus gallinarum</i>	2	tetM+tetL	2(100)
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1	tetL	1(100)
Autres <i>Enterococcus spp.</i>	2	tetL	1(50)
		tetW	1(50)

Les souches individuelles possédant les gènes ermB et ermA se sont montrées résistantes aux macrolides. Les éléments génétiques mobiles conjugatifs ont été identifiés dans 15,3% des souches, y compris dans toutes les souches hébergeant le gène tetM (**tableau VII**). Quelle que soit l'espèce, la résistance à l'érythromycine était associée à la présence du gène ermB constitutif. Il faut noter aussi qu'un pourcentage élevé de souches abritait également soit une combinaison des gènes ermA et ermB, ou uniquement le gène ermA (**tableau VII**). La présence des gènes mefA ou mefE et msrC était beaucoup moins fréquemment détectée. Dans le groupe de gènes codant pour la N-6 méthyltransférase, seuls ermB et ermA ont été identifiés séparément. L'amplification des gènes ermC emrB s'accompagnait toujours, et les gènes codant pour les pompes à efflux (mefA ou mefE, msrC) étaient toujours accompagnés des gènes ermB ou ermA, ou des deux (**tableau VII**).

Tableau VII: Diversité génotypique des souches d'entérocoques résistantes à l'érythromycine (ER).

Espèces	Nombre (%) souches						
	ER	euh	euhB	ermA + ermB	ermB + ermC	ermB+ mefA/E	ermA+ermB+ msrC
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	0	8(66.7)	2(16.7)	0	0	2(16.7)
<i>Enterococcus faecium</i>	15	3(20.0)	6(40.0)	2(13.3)	1(6.7)	2(13.3)	1(6.7)
Total	27	3(11.1)	15(51.9)	4(14.8)	1(3.7)	2(2.7)	3(11.1)

5. Discussion

Plus de la moitié des produits laitiers prêts-à-consommer analysés contenaient des bactéries du genre *Enterococcus*, et *E. faecium* était l'espèce prédominante. Les auteurs ont signalé que *E. faecium* (52,6%), *E. durans* (17,7%), *E. hirae* (16,4%) et *E. faecalis* (12,8%) étaient également les plus répandus dans les fromages serbes (**Bulajić et al., 2015**). Les proportions d'*E. faecium*, *E. durans* et *E. faecalis* dans le fromage bryndza slovaque ont été déterminées à 57,22 et 16%, respectivement (**Belicová et al., 2007**). **Jamet et al., (2012)** ont évalué 126 échantillons de fromages français traditionnels à pâte molle, mi-dure et dure et ont observé une prévalence élevée d'isolats d'*E. faecalis* (81%) par rapport à *E. faecium* (9,5%) et *E. durans* (7,7%). **Oguntoyinbo et Okueso, (2013)** ont rapporté des résultats similaires dans une étude de 30 échantillons de produits laitiers fermentés traditionnels (wara et nunu) fabriqués à partir de lait non-pasteurisé au Nigeria. Selon **Biendo et al., (2010)** les niveaux élevés de contamination des échantillons par les entérocoques peuvent être dus, par le fait que ces bactéries sont résistantes à la température de pasteurisation et montrent une résistance à différents substrats et conditions de développement (basse et haute température, pH extrême, salinité, etc.) dans ces environnements. La présence d'entérocoques dans les fromages de lait thermalisé ou pasteurisé indique que ces bactéries ne sont pas éliminées à la suite d'un traitement thermique ou d'une recontamination (**Jamet et al., 2012**). Il existe d'autres facteurs causant la contamination entérocoque du lait utilisé pour produire du fromage, elle peut résulter de bactéries présentes à la surface des trayons, du fumier ou de l'eau utilisée à la ferme, ou de bactéries qui ne peuvent être nettoyées des travailleurs de la ferme ou des machines à traire et des réservoirs de stockage (**Gelsomino et al., 2001; Gökmen et al., 2017**). La multi-résistance est un problème de santé publique croissant indiquent les auteurs, principalement, en raison de l'échec possible du

traitement thérapeutique des infections à entérocoques, en particulier chez les personnes immunodéprimées, qui peuvent évoluer vers une infection urinaire sévère, une endocardite ou une bactériémie (**Kayser, 2003**). Les résultats de cette étude ont montré que les entérocoques isolés des produits laitiers prêts-à-consommer peuvent être résistants aux antibiotiques couramment utilisés, pour traiter les infections humaines à entérocoques. La plupart des isolats analysés étaient résistants aux aminosides. Les phénotypes HLSR et HLGR sont particulièrement importants, car les aminosides utilisés en association avec les lactamines ont une synergie contre les infections à entérocoques (**Bartash et Nori, 2017**). Les résultats ont montré que près de la moitié des souches évaluées étaient hautement résistantes à la streptomycine. Les auteurs ont précisé que le phénotype HLSR était le plus souvent associé à l'enzyme Ant (6'), avec une activité nucléotidyltransférase, mais des isolats d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* ont également été trouvés héberger le gène ant(4'')-Ia, qui est fréquemment identifié dans les souches résistantes de *Staphylococcus aureus* (**Yadegar et al., 2009; Duran et al., 2012**). Les résultats obtenus indiquent un pourcentage élevé de souches, avec le phénotype HLSR que ceux récemment notés dans d'autres pays. Dans une étude de **Kürekci et al. (2016)**, seulement 5,8% (8 sur 139) des entérocoques isolés de fromages en Turquie étaient des HLSR. Quelques autres souches résistantes à la streptomycine (22%) ont été trouvées par **Gomes et al. (2008)** dans le fromage et la viande crue au Brésil. Les résultats observés sont en accord avec ceux de Teuber et al. (1999) qui annoncent avoir détecté le phénotype HLAR dans 80% des *Enterococcus* spp. isolés du fromage, et en indiquant que HLSR a une grande variation locale.

D'après **Asadollahi et al., (2018)**, les entérocoques sont de plus en plus résistants aux antibiotiques. En effet, les infections hospitalières causées par des entérocoques résistants à la vancomycine et au linézolide, médicaments de dernier recours dans le traitement des infections à entérocoques, sont particulièrement préoccupantes. Ces bactéries posent de sérieux problèmes thérapeutiques. Les auteurs notent que la vancomycine est utilisée dans le traitement des infections causées par les entérocoques multirésistants et dans la présente étude 2 des souches isolées d'*E. faecalis* étaient résistantes à cet antibiotique; les valeurs élevées de la CMI de ces souches (> 259 µg/mL de vancomycine) sont préoccupantes. Les analyses génotypiques n'ont pas révélé la présence des gènes vanA ou vanB; par conséquent, les auteurs ont émis l'hypothèse que la résistance à la vancomycine pourraient être codée par d'autres gènes qu'ils n'ont pas été analysés dans cette étude, tels que vanD,

vanE ou vanG. Des observations similaires ont été faites par **Gomes et al. (2008)** chez 3 souches d'*E. faecium* isolées de fromage. Une résistance à la vancomycine a également été notée chez les isolats d'*E. casseliflavus*, mais les analyses génotypiques n'ont révélé que la présence des gènes vanC2 ou vanC3, qui codent pour une résistance naturelle associée à une faible résistance constitutive à cet antibiotique. Ces résultats ont été confirmés par des valeurs de CMI, ne dépassant pas 32µg/mL de vancomycine. La présence d'entérocoques résistants à la vancomycine a été associée à l'avoparcine, un antibiotique glycopeptidique de structure similaire, qui a été ajouté à l'alimentation animale. Historiquement, des isolats résistants à la vancomycine ont été identifiés dans l'environnement non hospitalier dans les pays où l'avoparcine a été approuvée, pour une utilisation comme activateur de croissance (**Lauderdale et al., 2007**). En Europe, la prévalence d'isolats résistants à la vancomycine provenant de produits alimentaires d'origine animale diminue régulièrement depuis que l'avoparcine a été interdite en production animale (**Casewell et al., 2003**). Aux États-Unis, où l'avoparcine n'a jamais été utilisée en élevage, les entérocoques résistants à la vancomycine ont rarement été isolés chez les animaux destinés à l'alimentation (**Donabedian et al., 2010**). la présence signalée d'entérocoques résistants au linézolide (LRE; CMI 8µg/mL) est préoccupante et pas surprenante (**Krull et al., 2016**). Le linézolide a été le premier antimicrobien oxazolidinone en pratique médicale. Il est utilisé dans le traitement des infections causées par des souches multi-résistantes, incluant le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et le *S. aureus* et les entérocoques résistants à la vancomycine (**Flamm et al., 2013; Mendes et al., 2016**).

Le linézolide est souvent utilisé dans le traitement de la pneumonie multi-résistante et ultra-résistante ainsi que des infections bactériennes aiguës de la peau et des structures cutanées (**Anger et al., 2010**). L'utilisation du linézolide a été approuvée en l'an 2000, et la première souche d'entérocoque résistante à cet antimicrobien n'a été isolée qu'un an plus tard, ce qui illustre la capacité de ces bactéries à acquérir une résistance (**Mutnick et al., 2003**). Le premier LRE en Pologne a été isolé en septembre 2008 à partir d'un patient hospitalisé, et à partir de 2012, le nombre de LRE par an a généralement augmenté (**Gawryszewska et al., 2017**). Chez les entérocoques, la résistance au linézolide était initialement associée à une mutation dans la boucle centrale du domaine V du gène de l'ARNr 23S (**Bourgeois-Nicolaos et al., 2007; Ntokou et al., 2012**), ou à une mutation des protéines ribosomiques L3 et L4 (**Locke et al., 2009**). Un autre mécanisme de résistance au linézolide implique l'acquisition

du cfr (résistance au chloramphénicol-florfénicol) (**Kaminska et al., 2010**) ou des gènes cfr (B) (**Deshpande et al., 2015**), et la résistance peut être transférée. En 2015, un autre gène, *optrA*, également transférable entre souches bactériennes, a été détecté dans des isolats d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* résistants au linézolide, en provenance de Chine (**Wang et al., 2015**). Le gène *optrA* a également été identifié dans des isolats d'Italie, d'Irlande et de Malaisie par (**Brenciani et al., 2016; Mendes et al., 2016**).

En Pologne, la recherche sur le mécanisme sous-jacent et l'épidémiologie moléculaire des isolats de LRE a été menée uniquement sur des souches cliniques de la collection du Centre national de référence pour les tests de sensibilité de l'Institut national des médicaments à Varsovie (**Gawryszewska, et al., 2017**) et a démontré que dans les isolats polonais, la résistance au linézolide était le plus souvent causée, par la mutation G2576T dans le domaine V de l'ARNr 23S et la mutation T511G dans *rplD*. Le transporteur *OptrA* a été détecté dans 2 complexes clonaux d'entérocoques, non reliés d'un point de vue épidémiologique et sans haut risque de souches d'*E. faecalis* appartenant à ST116 (**Gawryszewska et al., 2017**). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour caractériser les isolats bactériens analysés provenant des produits laitiers.

Il est à noter qu'une résistance au linézolide a également été observée dans les isolats d'*E. casseliflavus*. Des entérocoques résistants au linézolide ont été identifiés pour la première fois en Pologne en 2008, en milieu hospitalier (**Gawryszewska et al., 2017**). La présence de LRE dans les aliments crus n'a pas été signalée, en Pologne à ce jour rapportent les auteurs et les LRE ont été identifiés pour la première fois dans les produits laitiers prêts-à-consommer dans le présent travail.

De nombreuses hypothèses existent sur les voies possibles de propagation des souches résistantes aux antibiotiques. Certaines études ont montré que le même gène de résistance a été trouvé dans des bactéries isolées à partir d'échantillons d'aliments et de patients (**Eaton et Gasson, 2001; Donabedian et al., 2003**). Les auteurs déclarent avoir démontré dans des études précédentes que les entérocoques isolés d'aliments prêts-à-consommer peuvent transférer des gènes de résistance à la souche *E. faecalis* JH2-2 (**Chajęcka Wierzchowska et al., 2019**). Il a été constaté que plus de 70 pour cent des souches testées étaient capables de transférer conjugalement au moins 1 des gènes de résistance aux antibiotiques. Les auteurs confirment la possibilité du transfert horizontal de gènes codant pour la résistance aux aminosides [*aac(6')*-*Ie-aph(2'')*]-*Ia*, *ant(6')*-*Ia*], aux tétracyclines (*tetM*,

tetL, tetO), et aux macrolides (ermA, ermB, msrC, mefAB). Le gène *int* a été transféré simultanément avec le gène *tetM*, ce qui indiquait qu'un transposon du Tn916 ou du Tn1545 participait également au processus de conjugaison. Des études menées par d'autres auteurs ont montré que le plasmide de résistance pAM β 1 a été transféré entre *E. faecalis*, *E. faecium* et *Lactobacillus reuteri*, dans le tractus gastro-intestinal de souris (Morelli et al., 1988). Le même plasmide a également été transféré entre des souches de *Lactobacillus curvatus* lors de la fermentation de saucisses (Marcinek et al., 1998). Ces observations soutiennent l'idée que les entérocoques résistants peuvent contaminer les aliments, pénétrer dans le tractus gastro-intestinal humain, coloniser les humains et transmettre des gènes de résistance aux bactéries commensales présentes dans le tractus gastro-intestinal humain (Giraffa et al., 1997). La résistance croissante des entérocoques aux antibiotiques et sa propagation dans les aliments suggèrent une situation de risque pour la communauté.

6. Conclusion

Les auteurs ont rappelé que les souches d'*Enterococcus* spp sont une microflore commune des produits laitiers. Les entérocoques sont un réservoir de gènes codant pour la multi-résistance qui pourraient être transférés à d'autres microorganismes pathogènes et non-pathogènes. Les auteurs reconnaissent que très peu est connu au sujet de la résistance aux antibiotiques des entérocoques d'origine alimentaire, autres que *E. faecalis* et *E. faecium*. Les résultats indiquent que *E. casseliflavus* et *E. gallinarum* peuvent être une source de gènes codant pour la résistance aux tétracyclines dans les produits laitiers. L'isolement de souches d'*Enterococcus* spp. résistantes à la vancomycine et au linézolide, médicaments de dernier recours dans le traitement des infections à entérocoques, est une situation particulièrement préoccupante. Les *Enterococcus* spp. isolés des produits alimentaires, y compris les aliments prêts-à-consommer, deviennent résistants à de multiples antibiotiques, soulignant la nécessité de surveiller la prévalence et l'occurrence des bactéries multi-résistantes pour garantir la sécurité alimentaire

7. Références Bibliographiques

Les auteurs ont choisi des références d'actualité et en relation avec le sujet traité dans le présent article.

Article 2: Microbial occurrence and antibiotic resistance in ready-to-go food items. Cole M.L., Singh O.V., 2018. *Journal of Food Science and Technology*. 55(7): 2600–2609.

Article disponible sur:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6033820/>

Description de l'étude

Cette étude décrit la présence microbienne liée à la résistance aux antibiotiques et le risque de transfert de gènes à d'autres agents pathogènes, dans différents aliments prêts-à-emporter. Elle a été réalisée par Cole et Singh et publiée dans le *Journal of Food Science and Technology*, en 2018.

Justification du choix de l'article

La thématique de l'article est proche du sujet du présent mémoire.

1. Résumé

Dans ce résumé, une mention sur la fréquence des agents pathogènes d'origine alimentaire, tels que *Escherichia coli* et *Salmonella*, couramment présents dans les produits alimentaires contaminés a été faite. Cette fréquence est en effet, la conséquence d'une utilisation excessive d'antibiotiques au cours des dernières décennies a conduit à une multitude de bactéries résistantes aux antibiotiques, y compris des agents pathogènes d'origine alimentaire. De ce fait, cette étude porte sur la présence microbienne et la résistance aux antibiotiques dans les aliments prêts-à-emporter, comme: les aliments en conserve, les aliments ensachés et les aliments pour bébés. Au total, 112 isolats ont été isolés à partir de divers aliments, et 21 de ces isolats ont été identifiés par séquençage d'ARNr 16S révélant la présence de *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. et *Micrococcus* sp. Les aliments ensachés présentaient la plus grande diversité microbienne ainsi qu'un plus grand nombre d'unités formant colonie (20-25 log UFC/g). Les isolats ont montré une résistance aux antibiotiques suivants : ampicilline, streptomycine, chloramphénicol et kanamycine à des concentrations de 100, 500 et 1000 µg/mL. Les isolats étaient résistants à l'ampicilline (57%), suivi de la kanamycine (26%). Une variété de microorganismes présents dans les aliments peut ne pas être pathogène, mais leur apparition et la résistance multiple aux antibiotiques présentent un risque de transfert de leurs gènes à des agents pathogènes d'origine alimentaire.

2. Introduction et objectifs

Dans cette partie les auteurs ont rapporté que la présence des microorganismes dans les aliments peut provoquer des maladies chez les humains et les animaux. *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, sont parmi les principaux microorganismes pathogènes d'origine alimentaire, entre autres **(CDC 2015; Foodsafety.gov 2016)**. Dans les efforts visant à limiter la quantité de microorganismes pathogènes dans les aliments prêts-à-emporter, les aliments en sachés et les aliments en conserve, diverses méthodes de conservation des aliments, à savoir traitements thermiques/basses températures, pressurisation, chimique, bio-conservation et irradiation, ont été créées. Cependant, certains microorganismes peuvent se développer dans des environnements extrêmes, notamment des pressions élevées, des radiations extrêmes, des conditions aérobies et anaérobies, une chaleur élevée, des antibiotiques et des températures basses **(Gabani et al., 2012; Woappi et al., 2016)**. La Food and Drug Administration (FDA) recommande une variété de techniques pour détecter la présence de microorganismes pathogènes. Les méthodes d'analyse bactériologique (BAM) impliquent l'échantillonnage de quantités spécifiques d'aliments, en fonction de trois facteurs: le groupe de consommateurs, la contamination pendant la fabrication et l'historique des aliments **(FDA, 2016)**.

L'antibiotique agit par un mécanisme d'action unique, mais avec le même résultat final pour désactiver l'activité du pathogène ou tuer les bactéries pathogènes **(Franco et al., 2009; Allen et al., 2014; Sharma et al., 2013)**. Cependant, la surutilisation et la mauvaise utilisation des antibiotiques ont conduit à l'évolution émergente de bactéries résistantes aux antibiotiques **(Bhunja 2008; Gabani et al., 2012; Woappi et al., 2016; Berman et Riley 2013; Wellington et al., 2013)**. Dans la présente étude, Les auteurs indiquent s'intéresser à l'étude de la présence des bactéries antibio-résistantes dans les produits alimentaires, provenant des épiceries locales, comme les aliments en conserve, les aliments en sac et les aliments pour bébés. De ce fait, il a été procédé à isolement et à l'identification des bactéries dans une variété d'aliments : pour bébés, ensachés et en conserve, et ensuite à la détection de la résistance aux antibiotiques parmi les isolats obtenus.

3. Matériel et méthodes

3.1 Acquisition des échantillons alimentaires

Les échantillons d'aliments ont été collectés des épiceries locales. Parmi ces échantillons d'aliments, un total de 26 échantillons était des aliments en conserve (ex. patates douces coupées, ignames confites, haricots noirs, haricots pinto, pois chiches garbanzas, feuilles de navet, feuilles de moutarde, asperges extra longues tendres, pois sucrés, haricots verts coupés, feuilles d'épinards coupées, mini O's et boulettes de viande, saumon rose, viande de bœuf et de poulet en pot, thon pâle en morceaux dans de l'huile végétale, saucisses de Vienne, bœuf séché tranché haché et formé, palourdes hachées dans du jus de palourdes, viande de qualité supérieure: porc, morceaux de qualité supérieure poulet blanc dans l'eau, carottes tranchées, maïs en grains entiers super doux, hachis de bœuf salé, morceaux et tiges de champignons, chou de comté assaisonné de style sud, betteraves tranchées) de 7 entreprises différentes. Un total de 9 échantillons était des aliments ensachés (haricots verts, brocoli, épinards, champignons, oignons verts, petits poivrons (assortiments), carottes, laitue râpée et radis) provenant de 6 entreprises différentes. Un total de 17 échantillons était des aliments pour bébés emballés dans des bocaux en verre (compote de pommes, patates douces et compote de pommes, dîner de riz à la dinde, poire abricot, légumes de blé entier, flocons d'avoine avec pommes, légumes et poulet, patates douces, pommes et bananes, poires, courges et pommes, petits pois et carottes, carottes, pomme mangue carotte, fruits et yaourt très petits fruits, pêches jaunes en dés, macaroni au fromage avec poulet et légumes) de deux entreprises différentes. Chaque échantillon d'aliment a été désigné par des lettres et des chiffres à des fins d'identification. Les aliments en conserve ont été désignés par C1-C26, les aliments ensachés ont été désignés par V1-V9 et les aliments pour bébés ont été désignés par F1-F17. Les aliments ont été obtenus d'épiceries locales et conservés à 4°C dans des conditions stériles jusqu'à ce qu'ils soient analysés. Chaque microorganisme isolé a été désigné par le type d'échantillon suivi des lettres chronologiques A, B, C, etc. (**Figs 1 et 2**).

3.2. Isolement des microorganismes des aliments

Les auteurs ont indiqué que toutes les surfaces de tous les emballages alimentaires ont été désinfectées à l'éthanol 70%, avant le prélèvement des échantillons. La présence microbienne dans les aliments sélectionnés a été observée par la méthode d'enrichissement.

La méthode d'enrichissement de croissance a été appliquée sur les échantillons d'aliments, par la mise en culture dans un flacon Erlenmeyer de 250ml à 32°C pendant 72h, de 1,0g d'aliment dans 50ml de bouillon nutritif stérile (prêt à l'emploi, Fisher Scientific, USA). Le milieu enrichi a été dilué en série et étalé sur boîtes de gélose nutritive (Fisher Scientific, USA). Les boîtes de gélose, qui contenaient plus de 200 colonies, ont été désignées comme indénombrable. Les colonies observées ont été séparées visuellement, isolées sur des géloses en pente, et conservées à 4°C, pour autres études.

3.3. Analyses des séquences d'ARNr 16S et d'arbres phylogénétiques

Les auteurs ont réalisé l'analyses en suivant ces étapes, tout d'abord les microorganismes ont été isolés et extraits pour l'ADN génomique total en utilisant PureLink™ Genomic DNA MiniKit K1820-01 (Invitrogen, USA). Les séquences du gène de l'ARNr 16S de tous les isolats ont ensuite été amplifiées à l'aide d'une amorce universelle (F-518: CCAGCAGCCGCGGTAATACG, R-800: TACCAGGGTATCTAATCC) et séquencées au MacroGen Service Center (Rockville, MD, USA). Toutes les séquences ont été comparées avec GenBank et Ribosomal Database Project (RDP) version 11 (<https://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). Les relations phylogénétiques entre les isolats alimentaires, avec divers agents pathogènes d'origine alimentaire, comme *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Serratia liquefacians*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli/ Shigella*, et *Klebsiella pneumonia*, ont été construites par la méthode de jointure voisine (NJ), avec suppression par paires des lacunes dans la base de données RDP.

3.4. Test de résistance aux antibiotiques

Chaque isolat microbien identifié de tous les types d'aliments a été testé pour sa résistance aux antibiotiques sur des boîtes de gélose nutritive additionnée de concentrations variables d'antibiotiques, allant de 100, 500 à 1000 µg/mL d'ampicilline, de streptomycine, de chloramphénicol et de kanamycine (obtenus auprès de Sigma-Aldrich, MO, États-Unis). Les boîtes de gélose nutritive ont été divisées en 16 sections pour strier les colonies isolées et étiquetées de manière appropriée. Une souche sensible aux antibiotiques d'*E. coli* a été utilisée comme témoin et striée une seule fois sur la première section de chaque boîte. Sur la base des études réalisées par Bengtsson-Palme et Larsson (2016) pour les concentrations d'antibiotiques prédites pour sélectionner des bactéries résistantes, dans la présente étude,

tout isolat ayant montré une croissance à 100 µg/mL sera considéré comme résistant aux antibiotiques. Les boîtes ont été incubées à 32°C pendant 72h et les résultats en termes de R (résistance) et S (Sensible) ont été enregistrés à des intervalles de temps de 24, 48 et 72h (**Tableau I**).

4. Résultats

4.1. Présence microbienne dans les échantillons d'aliments

Une variété de microorganismes a été observée à partir des aliments examinés. *Micrococcus yunnanensis* a présenté l'UFC le plus élevé (18,4 log UFC/g) dans le chou de style méridional assaisonné et dans les saucisses de Vienne (18,2 log UFC/g) (**Fig. 1**). Aucune différence n'a été observée entre les UFC des différentes entreprises. La séquence d'ARNr 16S des colonies isolées a révélé une grande variété de microorganismes, à savoir *Bacillus atrophaeus* (16 log UFC/g), *B. andreesenii* (10 log UFC/g), *Methylobacterium fujisawaense* (log UFC/g), et *Micrococcus yannanensis* (16 log UFC/g), ont été observés sur la moutarde verte (**Fig. 1**). Les haricots verts coupés et la moutarde verte ont révélé les UFC les plus élevées (7,6-24 log UFC/g), parmi les microorganismes identifiés. Parmi les microorganismes identifiés, 84% appartenaient à *Bacillus sp*, et 15% ont révélé une similarité avec *Micrococcus sp*. Par ailleurs, *M. fujisawaense* et *Staphylococcus xylosus* ont été trouvés dans la moutarde verte et les palourdes hachées dans du jus de palourdes, respectivement (Fig.1). La plus grande diversité de microorganismes ainsi que les UFC élevées ont concerné les aliments ensachés. Les plus abondants comprenaient *Bacillus aerophilus* (21 UFC/g) dans les haricots verts, et *Staphylococcus sp* (20,2 log UFC/g) dans les épinards (**Fig. 2**). Les séquences d'ARNr 16S ont révélé une proximité étroite avec *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp* et *Acinetobacter sp*, parmi les isolats d'aliments ensachés (haricots verts, brocoli, épinards, oignons verts, mini-poivrons, carottes, laitue râpée et radis). De manière unique, l'aliment aux mini-poivrons a montré la présence des trois types microbiens. Les champignons ont révélé la présence de *Kluyvera sp* (**Fig. 2**). Parmi les 17 aliments pour bébé examinés pour la présence microbienne (Fig. 2), seuls trois aliments, à savoir la compote de pommes, la courge et les pommes, et les macaronis au fromage ont révélé la présence de *Staphylococcus hominis* (1,6 log UFC/g), *Bacillus methylophilus* (15,6 log UFC/g) et *Paenibacillus vulneris* (0,3 log UFC/mL), respectivement (**Fig. 2**). La plupart des aliments n'ont révélé aucune croissance microbienne dans le bouillon nutritif.

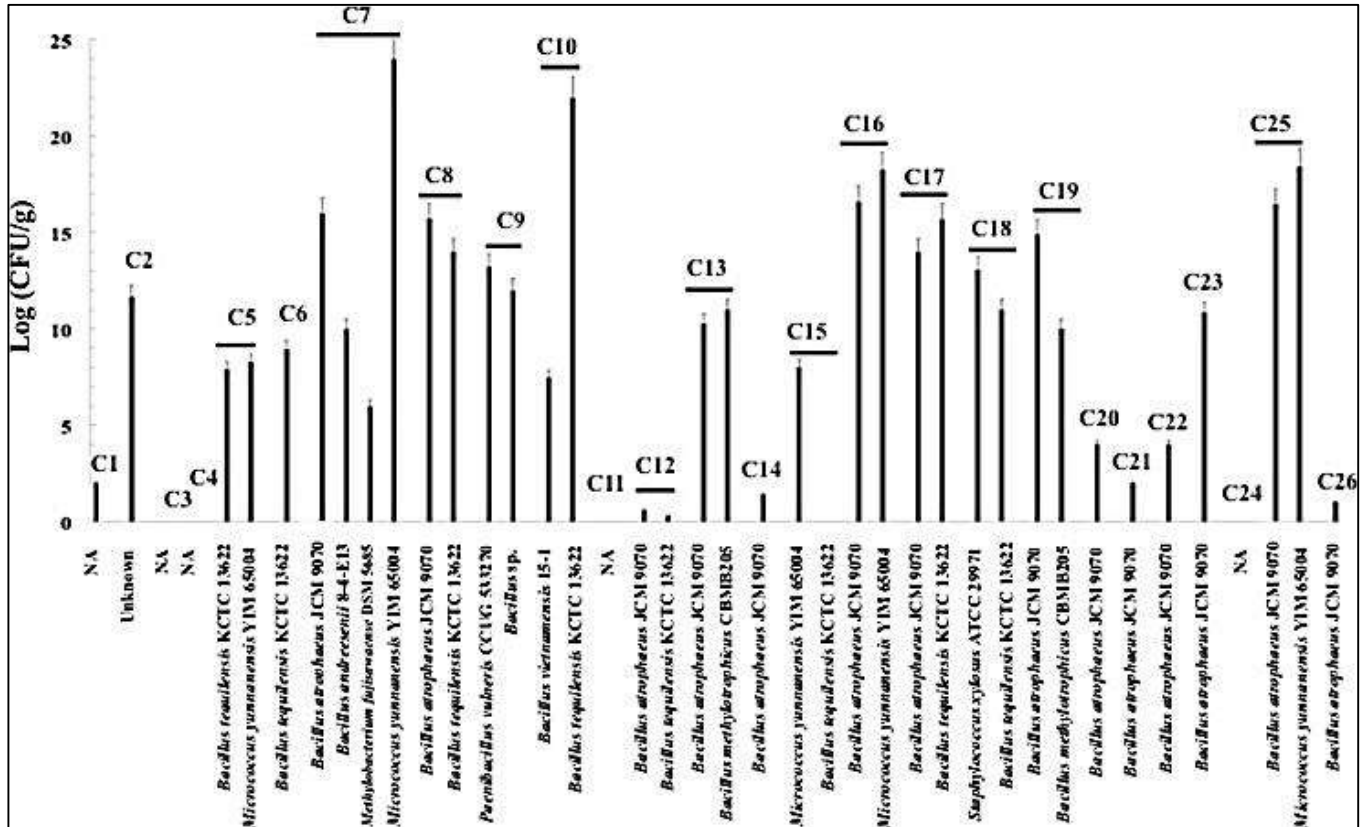


Figure1: Présence microbienne dans les aliments en conserve [c.-à-d. Patates douces coupées (C1) ; ignames confites (C2); Haricots noirs (C3) ; Haricots pinto (C4); Pois chiches Garbanzas (C5); Feuilles de navet (C6); Feuilles de moutarde (C7); Asperges extra longues tendres (C8) ; Pois de senteur (C9) ; Haricots verts coupés (C10); Épinard coupé en feuilles (C11); Mini O et boulettes de viande (C12); Saumon rose (C13); Viande en pot boeuf et poulet (C14); Morceaux de thon pâle à l'huile végétale (C15); saucisses viennoises (C16); Bœuf séché tranché haché et formé (C17); Palourde hachée au jus de palourde (C18); Viande déjeuner premium : porc (C19) ; Poulet blanc en morceaux de qualité supérieure dans l'eau (C20); Carottes tranchées (C21); Maïs entier (super doux) (C22); Hachis de bœuf salé (C23); Morceaux et tiges de champignons (C24); Chou de comté assaisonné de style méridional (C25); Betteraves tranchées (C26)].

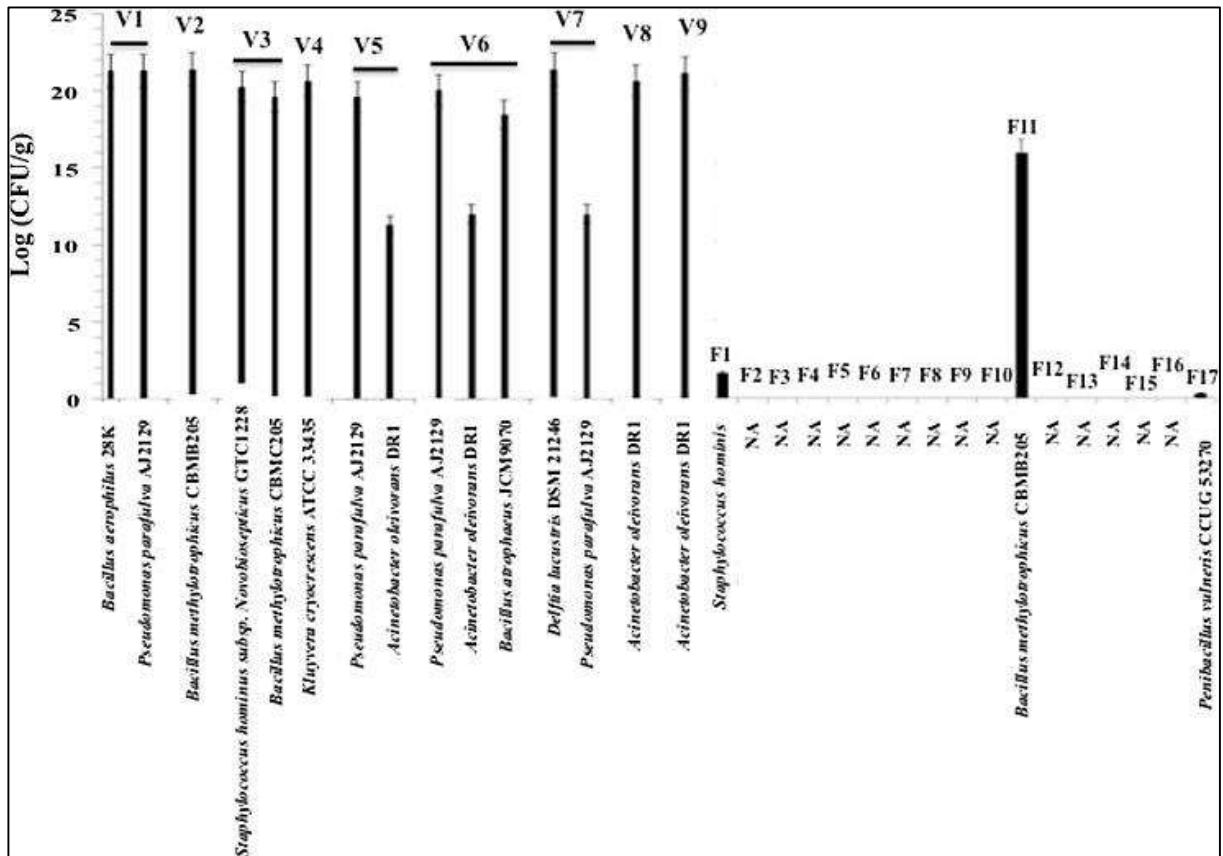


Figure 2: Présence microbienne dans les aliments ensachés (V1–V9) et pour bébés (F1–F17) [c.-à-d. Haricots verts (V1) ; Brocoli (V2) ; Épinards (V3) ; Champignons (V4) ; Oignon vert (V5) ; Petits poivrons (assortis) (V6); Carottes (V7) ; Laitue râpée (V8) ; Radis (V9) ; Compote de pommes (F1) ; Patates douces et Pommes (F2); Dîner de riz à la dinde (F3) ; Poire abricot (F4) ; Légume de blé entier (F5); Flocons d'avoine aux pommes (F6); Légumes et poulet (F7); Patates douces (F8); Pommes et banane (F9) ; Poires (F10); Courges et pommes (F11); Pois et carottes (F12); Carottes (F13); Pomme mangue carotte (F14); Fruits et yaourt : très petits fruits (F15) ; Pêches jaunes en dés (F16); Mac et fromage aux légumes (F17)]. Les isolats ont été identifiés à partir de culture pure sur des plaques NA en utilisant des séquences d'ARNr 16S.

Tableau I: Résistance aux antibiotiques parmi les microorganismes identifiés par l'ARNr 16S à partir de divers isolats alimentaires.

Organismes	Ampicilline (µg/mL)			Streptomycine (µg/mL)			Chloramphénicol (µg/mL)			Kanamycine (µg/mL)		
	100	500	1000	100	500	1000	100	500	1000	100	500	1000
Nourriture en Sac												
<i>Bacillus atrophaeus</i> JCM 9070	R*	S*	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>Delftia lacustris</i> DSM 4543	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
<i>Serratia proteamaculans</i> DSM 4543	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> DSM 420	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Acinetobacter oleivorans</i> DR1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas parafulva</i> AJ2129	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S
<i>Sphingobactérie kitahiroshimense</i> 10C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Exiguobacterium undae</i> DSM 14481	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas umsongensis</i> PS 3-10	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
<i>Xanthomonas gardneri</i> ATCC 19865	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Kluyvera cryocrescens</i> ATCC 33435	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Exiguobacterium antarcticum</i>	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
<i>Bacillus méthylotrophicus</i> CBMB 205	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Bacillus aerophilus</i> 28 K	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Ewingella americana</i> GTC 1277	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Sphingobacterium anhuiense</i> CW 186	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NOURRITURE EN BOITE												
<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 (T)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Bacillus andreesenii</i> 8-4-E13 (T)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 (T)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 (T)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Bacillus vietnamensis</i> 15-1 (T)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Methylobacterium fujisanaense</i> DSM 5686 (T)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Bacillus méthylotrophicus</i> CBMB 205 (T)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NOURRITURE POUR BEBE												
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>Novobiosepticus</i> GTC 1228 (T)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Bacillus méthylotrophicus</i> CBMB 205 (T)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Paenibacillus vulneris</i> CCG 53270 (T)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

* R: résistance, *S: sensibilité.

4.2 Relations phylogénétiques des microorganismes identifiés avec les agents pathogènes d'origine alimentaire

Le séquençage de l'ARNr 16S via l'ADN génomique amplifié a identifié les isolats microbiens acquis à partir des produits alimentaires. Le séquençage de l'ARNr 16S a révélé 954 paires de bases (pb), 959, 948, 955, 918, 952, 943, 950, 933, 949, 703, 944, 957, 132, 1032, 957, 955, 945, 934, 952, 950, 950, 935, 953, 935, 939, 962, 953, 834, et 932 pb amplifiées à partir d'ADN génomique, en utilisant les amorces F518, et a montré des niveaux significatifs de similarité de séquence dans la base de données ribosomal à *Bacillus atrophaeus*, *Staphylococcus xylosus*, *Delftia lacustris*, *Staphylococcus petrasii* subsp. *jettensis*, *Serratia proteamaculans*, *Paenarthrobacter nicotinovorans*, *Acinetobacter oleivorans*, *Pseudomonas hunanensis*, *Sphingobacterium anhuiense*, *Exiguobacterium antarcticum*, *Exiguobacterium alkaliphilum*, *Pseudomonas prosekii*, *Xanthomonas campestris*, *Buttiauxella ferragutiae*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Micrococcus yunnanensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus altitudinis*, *Paenibacillus vulneris*, *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Ewingella americana*, *Sphingobacterium anhuiense*, *Micrococcus yunnanensis*, *Brevibacterium frigoritolerans*, *Methylobacterium fujisawaense*, respectivement. Les microorganismes identifiés ont été désignés par leurs désignations respectives, c'est-à-dire MC1-MC40.

Les séquences de tous les isolats ont été respectivement déposées dans la base de données GenBank et les numéros d'accession ont été obtenus: KX225428: *Bacillus atrophaeus* -MC3; KX225429 : *Staphylococcus xylosus* -MC5; KX225430: *Delftia lacustris* —MC6; KX225431: *Staphylococcus petrasii* sub sp je ettensis -MC7; KX225432: *Serratia proteamaculans* -MC9; KX225433: *Arthrobacter nicotinovorans* -MC10; KX225434: *Acinetobacter oleivorans* -MC12 ; KX225435: *Pseudomonas hunanensis* —MC13; KX225436: *Sphingobacterium anhuiense* -MC14; KX225437: *Exiguobacterium antarcticum* -MC15; KX225438: *Pseudomonas prosekii* —MC18; KX225439: *Xanthomonas campestris* —MC20; KX225440: *Buttiauxella ferragutiae* -MC21; KX225441 : *Micrococcus yunnanensis* -MC23; KX225442: *Bacillus subtilis* -MC26; KX225443: *Bacillus methylotrophicus* -MC27 ; KX225444: *Bacillus atrophaeus*—MC28; KX225445: *Bacillus invictae* -MC29; KX225446: *Paenibacillus vulneris* —MC30 ; KX225447: *Bacillus subtilis* sub sp *inaquosorum* -MC31; KX225448 : *Bacillus atrophaeus* -MC32; KX225449 : *Bacillus subtilis* sub sp *inaquosorum* -MC34; KX225450 : *Bacillus atrophaeus* -

MC35; KX225451: *Ewingella Americana* -MC36; KX225452: *Sphingobacterium anhuiense* -MC37; KX225453: *Micrococcus yunnanensis* —MC38; KX225454: *Bacillus methylotrophicus* -MC39; KX225455: *Methylobacterium fujiisawaense* -MC41. Les microorganismes *Exiguobacterium alkaliphilum*, *Pseudomonas chlororaphis* et *Brevibacterium frigoritolerans* désignés, pour MC17, MC22 et MC40, respectivement ont montré un score BLAST inférieur à 90% de leur longueur totale et n'ont pas reçu de numéros d'accèsion.

Les relations phylogénétiques entre les isolats alimentaires avec divers agents pathogènes d'origine alimentaire à savoir: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Serratia liquefacians*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli/ Shigella* et *Klebsiella pneumonia*, fournissent des distances approximatives dans les arbres voisins qui se joignent à l'arbre représentant leur relation entre eux et les agents pathogènes d'origine alimentaire dans la base de données (**Fig. 3a-c**). Les microorganismes *Exiguobacterium antarcticum* (MC22) et *Bacillus vietnamensis* (MC40) semblent être à l'extrémité distale par rapport aux agents pathogènes d'origine alimentaire (**Fig. 3a-c**). Le microorganisme *Staphylococcus xylosus* (MC5) et *Listeria monocytogenes* ont révélé une association étroite (**Fig. 3une**). Comme il a été prévu *Serratia proteamaculans* (MC9) montre une proximité étroite avec *Salmonella enterica* et *Serratia liquefacians* (**Fig. 3a, b**). Les deux isolats MC9 et MC36 ont révélé une relation étroite avec les agents pathogènes d'origine alimentaire *Escherichia coli/ Shigella* et *Klebsiella pneumonia* (**Fig. 3c**).

4.2. Résistance aux antibiotiques parmi les isolats d'origine alimentaire

La résistance aux antibiotiques parmi les 112 isolats a été examinée contre les antibiotiques couramment utilisés, à savoir l'ampicilline, la streptomycine, le chloramphénicol et la kanamycine à des concentrations variables (100, 500 et 1000 µg/mL) (**Tableau I**). L'ampicilline a révélé que 64 isolats étaient résistants entre 100 µg/mL et 1000 µg/mL, ce qui correspond à 57%. Au total, 18 isolats ont révélé une résistance aux antibiotiques contre le chloramphénicol, donnant une résistance globale de 16%. Individuellement, parmi les aliments en conserve, le microorganisme *Micrococcus yunnanensis* isolé à partir de pois chiches, vert moutarde, thon pâle en morceaux, saucisses de Vienne, et chou de campagne du sud assaisonné a révélé une poly-résistance aux antibiotiques: ampicilline (100 µg/mL) et kanamycine (100 et 500 µg/mL) (**Tableau I**).

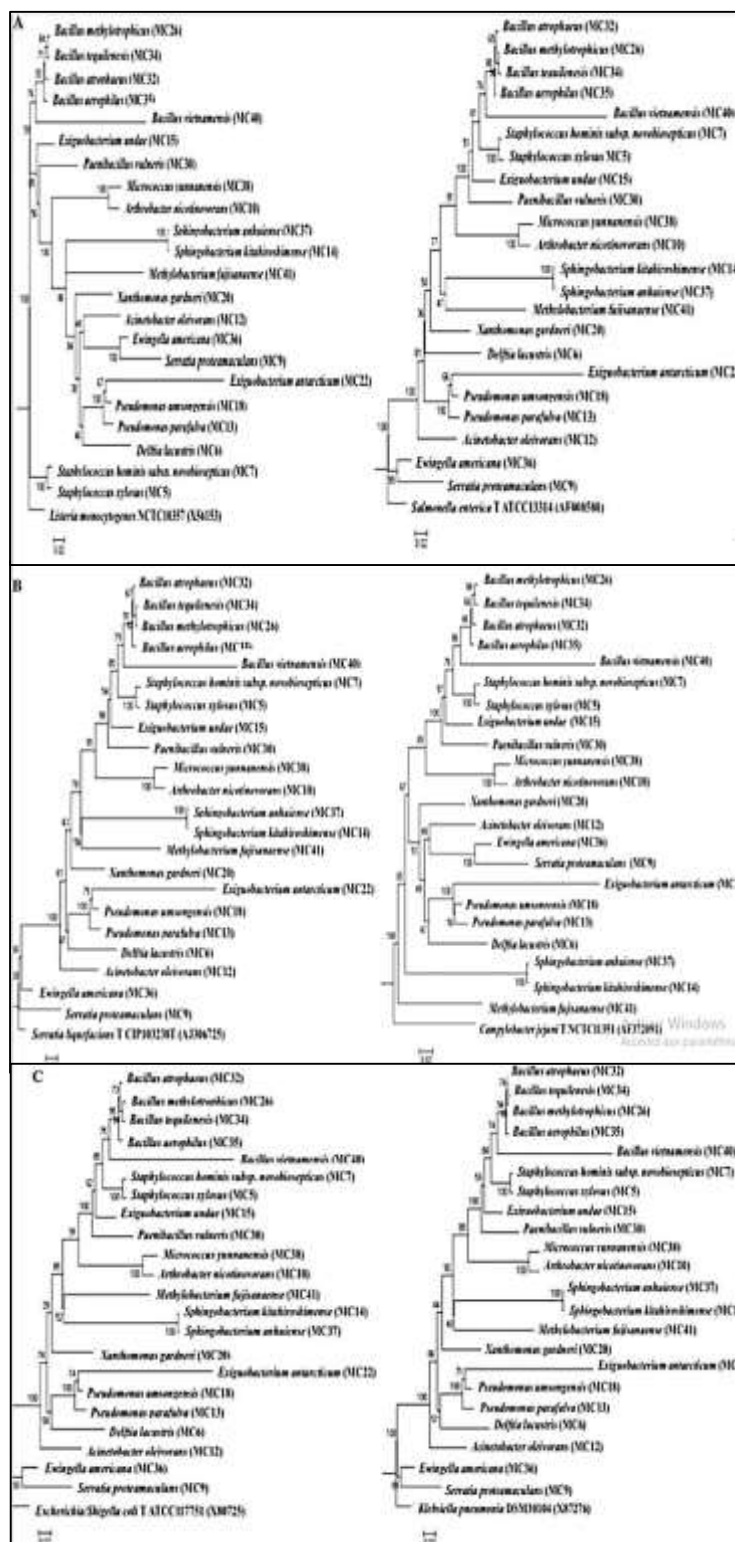


Figure 3 a-c : Arbre phylogénétique basé sur la séquence du gène de l'ARNr 16S, se joignant au voisin, montrant une relation entre les isolats microbiens provenant d'aliments en conserve, en sac et pour bébés montrant une proximité étroite avec les homologues respectifs. Les isolats ont été comparés pour leur distance génétique à des agents pathogènes d'origine alimentaire, une *Listeria monocytogenes* ; *Salmonella enterica*; *Liquéfaciens Serratia* ; *Campylobacter jejuni* ; *c Escherichia/ Shigella coli* ; *Pneumonie à Klebsiella*. Les nombres aux nœuds indiquent les niveaux de prise en charge du bootstrap sur la base d'une analyse de jointure par voisins de 1000 ensembles de données rééchantillonnés. Barre, cinq substitutions pour 1000 positions de nucléotides.

Dans cette étude les isolats d'aliments ensachés ont montré une plus grande résistance que les isolats d'aliments en conserve et pour bébés. *Bacillus atrophaeus*, *Delftia lacustris* et *Serratia proteamaculans* se sont montrés multi-résistants contre l'ampicilline, la streptomycine et la kanamycine (100–1000 µg/mL) (**Tableau I**). *Pseudomonas parafulva* a révélé une résistance à la streptomycine, au chromamphénicol et à la kanamycine, mais à une concentration plus faible (100 µg/mL). De même, *P. umsongensis* a montré une résistance contre l'ampicilline, le chloramphénicol et la kanamycine à une concentration plus faible (100 µg/mL) (**Tableau I**).

5. Discussion

Les auteurs rappellent que les aliments prêts-à-emporter sont pratiqués pour limiter la présence microbienne, en utilisant diverses techniques de conservation, y compris les méthodes de traitement thermique (pasteurisation, ébullition, mise en conserve), la conservation à basse température (réfrigération à 32°-38°F ou congélation à < 32°F/0°C), les bio-conservateurs (fermentation), la réduction de la disponibilité d'eau (séchage, fumage, pression osmotique, lyophilisation), la conservation chimique (fumage, benzoate de sodium, nitrates, sulfites), l'exclusion d'oxygène (remplacer l'oxygène par de l'azote), l'ultra-haute pression (111 000 psi) , et l'irradiation qui est limitée au poulet, aux fruits, aux légumes et aux produits de bœuf haché (**Ananou et al., 2007; Dave et Ghaly, 2011; Aneja et al., 2014**).

5.1 Présence microbienne parmi les aliments en conserve

Les auteurs rapportent qu'une variété d'aliments emballés dans des boîtes de conserve ne laissent pas entrer l'oxygène; par conséquent, ces conditions ne sont pas optimales pour la croissance des microorganismes aérobies. Cependant, il existe plusieurs agents pathogènes qui peuvent résister aux conditions anaérobies, y compris *Bacteroides* (provoque des infections intra-abdominales), *Clostridium* (connu pour l'intoxication alimentaire et le botulisme pathogène) et *Actinomyces* (provoque diverses infections). Les aliments en conserve ont montré une diversité et des UFC significatives parmi les microorganismes. La présence d'actinobactéries (*Micrococcus yunnanensis*) a révélé un taux de 18,4 log UFC/g (Fig. 1). La séquence d'ARNr 16S des colonies isolées a montré une grande variété de microorganismes inclus dans le phyla des Firmicutes (comme *Bacillus atrophaeus*, *B. andreesenii*, *Staphylococcus xylosus*), les protéobactéries (*M. fujisawaense*) et les

actinobactéries (**Fig. 3a–c**). Les auteurs rapportent que même si les *Bacillus* sp. ont des avantages de pour la santé humaine, certains sont associés à une grande variété d'aliments, y compris les viandes, le lait, les légumes et le poisson, etc., et provoquent une intoxication alimentaire de type diarrhéique. La présence de *Bacillus* sp. dans les pointes d'asperges extra longues et tendres dans cette étude coïncide avec des études antérieures, selon lesquelles *Bacillus* sp. est également l'un des agents pathogènes les plus répandus dans les légumes à feuilles vertes (**Elhariry 2011; Tango et al. 2014**). Quant au genre *Methylobacterium* est omniprésent dans la nature et peut être détecté dans le sol et les environnements d'eau douce, y compris l'eau potable (**Gallego et al., 2005**). Dans la présente étude les espèces de *Staphylococcus* sont les plus couramment trouvées, ce qui est en accord avec les données de certains travaux. Par exemple, *Staphylococcus xylosus* (Micrococcaceae) est l'espèce la plus importante signalée dans de nombreuses saucisses italiennes et espagnoles, dans la viande slovaque et dans la viande salée traditionnelle tunisienne (**Essid et al., 2007; Simonova` et al., 2006**).

5.2 Présence microbienne parmi les aliments ensachés

Dans la présente étude, aucune bactérie pathogène n'a été trouvée; cependant, la présence microbienne et la multi-résistance aux antibiotiques présentent un risque accru de transfert de des gènes à des agents pathogènes d'origine alimentaire. Des microorganismes d'altération des aliments ont été observés dans tous les aliments ensachés (**Fig. 2**). La relation entre des isolats retenus et les microorganismes pathogènes est montrée dans les arbres phylogénétiques voisins (**Fig. 3a–c**).

Les légumes ensachés, y compris les salades prêtes- à-consommer, les épinards, le brocoli, les champignons, les carottes, les haricots verts et autres, sont de plus en plus idéaux pour les consommateurs, en raison de leur commodité, ainsi que de leurs bienfaits pour la santé, notamment les vitamines, les minéraux et les antioxydants. Cependant, une menace vient avec cette commodité, et concerne les pathogènes d'origine alimentaire. La croissance d'agents pathogènes tels que *E. coli* O157:H7, *Salmonella* et *L. monocytogenes* peut être limitée à ≤ 4 °C. Cependant, des études sur des produits congelés ont montré la survie de ces agents pathogènes jusqu'à 24 jours après le stockage (**Jung et al., 2014**).

Les légumes frais ensachés sont les préférés des consommateurs, en raison de leur prix abordable et leur aventure savoureuse, car ils font partie intégrante d'une matrice saine,

fournissant au consommateur des vitamines, des minéraux, des antioxydants et d'autres composés favorisant la santé (**State of the plate, 2017**). Cependant, le frais peut être contaminé par des agents pathogènes humains provoquant des maladies mortelles. Des épidémies sans fin d'agents pathogènes d'origine alimentaire (**Jung et al 2014; Cole et Singh 2016; Josephs-Spaulling et al., 2016**) se sont imposées pour explorer la présence microbienne dans les légumes frais. **Jung et al. (2014)** ont examiné l'effet de la chaîne de production alimentaire, des pratiques agricoles à la transformation des légumes, sur l'incidence des épidémies. **Jeddi et al. (2014)** ont révélé une présence microbienne dans les légumes frais coupés, les salades prêtes-à-consommer et les haricots mungo.

5.3 Présence microbienne dans les aliments pour bébés

Les auteurs rapportent examiner un total de 17 aliments pour bébés emballés dans des bocaux en verre, pour détecter la présence microbienne (**Fig. 2**), et la plupart n'ont révélé aucune croissance microbienne. En raison du système immunitaire sous-développé, les nourrissons et les jeunes enfants sont toujours à risque d'infections bactériennes d'origine alimentaire. Les aliments en poudre pour bébés sous différentes formes sont largement utilisés pour des raisons pratiques et économiques. Un groupe de consultation conjointe FAO/OMS (2004-2006) a identifié les microorganismes spécifiques contaminants les préparations en poudre pour nourrissons, comme *Cronobacter* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Salmonella enteritidis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter koseri*, *Acinetobacter* sp., *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Serratia* sp., *Staphylococcus* sp. et *Listeria monocytogenes*. Parmi ces microorganismes, *Cronobacter* sp. et *Salmonella enterica* ont été identifiés comme les agents pathogènes les plus courants dans les préparations en poudre pour nourrissons. Dans ce cadre, la Food and Drug Administration des États-Unis a publié une lettre aux professionnels de la santé sur les infections à *Enterobacter sakazakii* associées à l'utilisation des préparations en poudre pour nourrissons dans les unités de soins intensifs néonataux (**FDA, 2002**).

5.4 Relations phylogénétiques des isolats

Les auteurs ont démontré l'existence d'une relation proche entre les isolats alimentaires et le pathogène d'origine alimentaire *Campylobacter jejuni* (Fig. 3b). **Champion et al. (2005)** ont rapporté la phylogénomique comparative du pathogène d'origine alimentaire *Campylobacter jejuni*, qui pourrait fournir un prototype méthodologique robuste et pourrait être applicable à d'autres microorganismes. Les données des auteurs fournissent des ressemblances génétiques entre *Serratia proteamaculans* et *Campylobacter jejuni* révélant des marqueurs génétiques prédictifs d'infections des microorganismes sources *Serratia proteamaculans* (MC9) et *Ewingella americana* (MC36). **Sprozer et al. (1999)** ont rapporté la relation phylogénétique de 38 espèces avec les entérobactéries, par analyse comparative de l'ADNr 16S. Les présents résultats annoncent aussi une similarité de séquence d'ARNr 16S supérieure à 95%, parmi les isolats des différents genres de la famille des entérobactéries (Fig. 3a–c)

5.5 Résistance aux antibiotiques dans les isolats alimentaires

Les auteurs rappellent que les antibiotiques ont été surutilisés dans les sociétés humaines et animales. Par conséquent, les bactéries ont développé une résistance aux antibiotiques (**Verraes et al., 2013**). Les usages des antibiotiques en agriculture permettent aux microorganismes d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques (**Durso et Cook, 2014**). Certains microorganismes d'origine alimentaire ont été identifiés comme réservoirs de résistance aux antibiotiques (bactéries lactiques) ainsi que comme phénotypes de résistance aux antibiotiques dans les produits alimentaires fermentés (*S. thermophilus* et *L. helveticus*) (**Devirgiliis et al., 2014**). **Marder et al. 2014**, ont montré que des épidémies de *STEC O157* associées aux épinards et à la laitue contenaient des séquences d'ADN résistantes aux antibiotiques (**Berman et Riley, 2013**).

L'utilisation d'antibiotiques a été une composante importante du système de santé publique et animale pour le traitement des maladies infectieuses signalent les auteurs. La présence de résidus d'antibiotiques dans les milieux aquatiques et alimentaires d'origine animale et végétale représente une préoccupation majeure, car une exposition constante aux antibiotiques constitue un grave danger pour la santé des humains et de l'environnement. L'aliment agit comme un navire de transport pour les bactéries résistantes aux antibiotiques et les gènes de résistance à l'homme, par le biais des produits agricoles (bœuf, poulet, porc

et produits végétaux), le ruissellement agricole dans l'eau d'irrigation (utilisée sur la végétation et le sol) et le processus d'emballage des aliments (Verraes et al., 2013; Durso et Cook 2014). Dans le présent travail, la sensibilité des isolats bactériens à quatre antibiotiques différents couramment utilisés a été testée. Une multi-résistance a été observée parmi quelques isolats (Tableau I) provenant d'aliments ensachés. Le niveau de résistance aux antibiotiques n'a pas pu être évalué, en raison de l'intervalle variable du temps.

6. Conclusion

Dans la conclusion de cet article les auteurs ont fait le point sur les résultats obtenus, en indiquant qu'une grande variété de microorganismes a été observée dans les aliments prêts-empoter, ces microorganismes peuvent ne pas être pathogènes, mais sont résistants aux antibiotiques. Parmi, les 112 isolats provenant d'aliments prêts-empoter, 21 isolats au total ont été identifiés par séquençage d'ARNr 16S révélant la présence de *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. et *Micrococcus* sp. Une plus grande diversité microbienne et un nombre d'UFC plus élevé (20-25 log UFC/g) ont été obtenus à partir des aliments ensachés, révélant une résistance aux antibiotiques contre l'ampicilline (57%) suivie de la kanamycine (26%). Les isolats ont montré une résistance aux antibiotiques à l'ampicilline, à la streptomycine, au chloramphénicol et à la kanamycine à des concentrations de 100, 500 et 1000 µg/mL. La multi-résistance a été remarquée chez *B. atropheus*, *D. Lacustris*, *S. proteamaculans*, *P. parafulva* et *P. umsongensis* posant un risque intense de transfert de gènes dans d'autres agents pathogènes dans la nature. La survie des bactéries dans des techniques difficiles de transformation ou de conservation des aliments peut être due à leur capacité à se maintenir (c'est-à-dire, la formation de spores et/ou la paroi cellulaire intacte) dans des conditions environnementales difficiles. L'utilisation excessive d'antibiotiques dans l'agriculture a produit des bactéries qui peuvent prospérer dans un large éventail d'antibiotiques et devenir des extrêmophiles résistants aux antibiotiques.

7. Références Bibliographiques

Les auteurs ont utilisé des références en relation avec le sujet traité.

- Comparaison des deux articles –

Une lecture approfondie des deux articles a montré une divergence dans les méthodes suivies pour réaliser les deux recherches. Pour les espèces microbiennes étudiées, dans le premier article de **Chajęcka-Wierzchowska et al., (2020)**, les auteurs ont visé les *entérocoques* dans les produits laitiers fermentés dans une région de Pologne, ainsi que l'acquisitions des gènes de résistances transférables. Le second article de **Cole et Singh, (2018)** a démontré la présence de nombreux agents pathogènes d'origine alimentaire dans les aliments prêt-à-emporter (boite de conserve, aliments ensachés, aliments pour bébés) provenant des épiceries locales. Certains des isolats obtenus ont exhibé une multi-résistance aux antibiotiques testés.

Conclusion

Conclusion

La présence de bactéries antibio-résistantes dans divers produits alimentaires devient une situation préoccupante et incontrôlée, vu son effet négatif sur la santé humaine et animale. Ces bactéries peuvent apparaître dans le microbiome intestinal humain, le transformant ainsi, en un réservoir majeur de gènes de résistance aux antibiotiques (**Puig-Peña et al., 2020**).

C'est dans ce contexte que ce travail s'est penché essentiellement à la présentation de deux articles scientifiques, ciblant la problématique, afin de constater cette réalité à travers les résultats obtenus par des chercheurs ayant travaillé dans ce sens.

Sur la caractérisation des *Enterococcus* spp isolés à partir de produits laitiers fermentés et leurs profils génétiques de résistances aux antibiotiques testés, **Chajęcka-Wierzchowska et al., (2020)** ont signalé la présence des espèces *E. faecium* (52,6%), *E. durans* (à 17,7%), *E. hirae* (16,4%) et *E. faecalis* (12,8%) dans les fromages serbes analysés et presque le même pourcentage a aussi été trouvé dans les fromages slovaques. Par contre, les fromages français traditionnels à pâte molle, mi-dure et dure ont montré une prévalence d'*E. faecalis* (81 %), d'*E. faecium* (9,5 %) et d'*E. durans* (7,7%). La plupart des souches testées ont exhibé une résistance à la streptomycine, à l'érythromycine, à la tétracycline, à la rifampicine et à la tigécycline, et aucune résistance n'a été observée quant à l'ampicilline, la teicoplanine ou à la ciprofloxacine. L'identification de quelques gènes de résistance, comme ceux de la tétracycline (*i.e. tetK, tetL, tetM et tetW*) a été réalisée par l'application des techniques PCR et PCR multiplexe. Les résultats de cette analyse ont confirmé le profil génétique de quelques résistances observées, notamment celles à la tétracycline et aux aminosides.

L'étude de **Cole et Singh (2018)** portée sur la recherche de bactéries antibio-résistantes dans différents types d'aliments prêts-à-emporter a confirmé la présence dans les échantillons étudiés de germes qui peuvent ne pas être pathogènes, et dont le séquençage de l'ARN 16S a révélé la dominance d'isolats appartenant aux genres: *Bacillus*, *Staphylococcus*, et *Micrococcus*, avec une résistance notable à l'ampicilline, à la streptomycine, au chloramphénicol et à la kanamycine.

Somme toute, les données rassemblées au cours de la réalisation de ce travail que ce soit de la revue bibliographique ou des deux articles présentés, le problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques, en relation avec les aliments demeure une réalité très préoccupante, qui nécessite davantage d'attention, pour au moins protéger la santé du consommateur.

Références Bibliographiques

- **Alegbeleye O.O., Singleton I & Sant'Ana A., 2018.** Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*, **73**: 177–208.
- **Alonso A., Sanchez P & Martinez J.L., 2001.** Environmental selection of antibiotics resistance genes. *Environmental Microbiology*, **3(1)**:1-9.
- **Anderson R. M., 1999.** The pandemic of antibiotic resistance. *Nature Medicine*, **5(2)**: 147-149.
- **Andersson D.I., Balaban N.Q., Baquero F., Courvalin P., Glaser P., Gophna U., Kishony R., Molin S & Tønjum T., 2020.** Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. *FEMS Microbiology Reviews*, **44**: 171–188.
- **Arathy D.S., Vanpee G., Belot G., Mathew V., De Allie C & Sharma R., 2011.** Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* isolated from commercial chicken eggs in Grenada, West Indies. *The West Indian medical journal*, **60(1)**:53-6.
- **Ayoyi A. O., Bii C.C & Okemo P., 2008.** Detection of antibiotic resistance and virulence related factors in *Escherichia coli* isolates from broiler chicken in Limuru, Kenya. *International Journal of Infectious Diseases*, **12(1)**:e109–e110.
- **Bandyopadhyay S., & Idranil S., 2020.** Antimicrobial Resistance in Agri-Food Chain and Companion Animals as a Re-emerging Menace in Post-COVID Epoch: Low-and Middle-Income Countries Perspective and Mitigation Strategies. *Frontiers in Veterinary Science*, **7**:620.
- **Baquero F., Lanza V.F., Duval M & Coque T.M., 2020.** Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, **113(3)**:570-579.
- **Barraud O., Peyre M., Couvé-Deacon E., Chainier D., Bahans C., Guignon V., Ploy M-C., Bedu A & Garnier F., 2018.** Antibiotic Resistance Acquisition in the First Week of Life. *Frontiers in Microbiology*, **9**: 1467.
- **Becker D., E., 2013.** Antimicrobial Drugs. *Anesthesia Progress*, **60(3)**: 111–123.
- **Bendeković J., Naletina D & Nola I. 2015.** Food safety and food quality in the supply chain. *Conference Paper*.
- **Bengtsson-Palme J., Kristiansson E & Larsson Joakim D.G., 2018.** Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, **42(1)**: 68-77.
- **Berger C.N., Sodha S.V., Shaw R.K., Griffin P.M., Pink D., Paul H., & Frankel G., 2010.** Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, **12(9)**:2385-97.
- **Bisht R., Katiyar A., Singh R & Mittal P., 2009.** Antibiotic-resistance a global issue of concern. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **2(2)**: 34-38.
- **Boerlin P & White D.G., 2013.** Antimicrobial resistance and its epidemiology. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, **3**: 21-40.
- **Bolotin E., & Hershberg R., 2017.** Horizontally Acquired Genes Are Often Shared between Closely Related Bacterial Species. *Frontiers In Microbiology*, **8**:1536.
- **Boto L., 2010.** Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proceedings. Biological Sciences*, **277(1683)**: 819–827.
- **Braden C.R., 2006.** *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* and eggs: a national epidemic in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, **43(4)**:512-7.
- **Breijyeh Z., Jubeh B & Karaman R., 2020.** Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, **25(6)**:1340.

- Briet A., Brisabois A., Debuiche S., Delannoy S., Helsens N., Midelet G & Granier S.A. 2018. NDM-1-producing *Vibrio parahaemolyticus* isolated from imported seafood. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **73(9)**:2578-2579.
- Callejón R.M., Rodríguez-Naranjo M.I., Ubeda C., Hornedo-Ortega R., Garcia-Parrilla C., & Troncoso A.M., 2015. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. *Foodborne pathogens and disease*, **12(1)**:32-8.
- Castro-Vergas R.E., Herrera-Shansez M.P & Rondon-Barragan S.L., 2020. Antibiotic resistance in *Salmonella spp.* isolated from poultry: A global overview. *Veterinary World*, **13(10)**: 2070–2084.
- CDC 2013: Centers for Disease Control, 2013. Multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 infections linked to ready-to-eat salads. Centers for Disease Control and Prevention.
- Cesur S & Demiröz A.P., 2013. Antibiotic and the mechanisms of resistance to antibiotics. *Medical Journal of Islamic World Academy of Science*, **21(4)**: 138-142.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska A & García-Solache, M. (2020). Ready-to-eat dairy products as a source of multidrug-resistant *Enterococcus* strains: Phenotypic and genotypic characteristics. *Journal of Dairy Science*, **103(5)**: 4068–4077.
- Checucci A, Trevisi P, Luise D, Modesto M, Blasioli S, Braschi I & Mattarelli P 2020. Exploring the Animal Waste Resistome: The Spread of Antimicrobial Resistance Genes Through the Use of Livestock Manure. *Frontiers Microbiology*. **11**:1416.
- Chen M., Wu Q., Wu Q., Zhang J., Guo W., Wu S., & Yang X., 2014. Prevalence and contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in *Flammulina velutipes* Plants. *Foodborne Pathogens and Disease*, **11(8)**: 7-620.
- Chen Z., Bai J., Wang S., Zhang X., Zhan Z., Shen H., Zhang H., Wen J., Gao Y., Liao M., & Zhang J., 2020. Prevalence, antimicrobial resistance, virulence genes and genetic diversity of *Salmonella* isolated from retail duck meat in Southern China. *Microorganisms*, **8(3)**: 444– 455.
- Coculescu., 2009. Antimicrobial resistance induced by genetic changes. *Journal of medicine and Life*, **2(2)**: 114–123.
- Couce & Blázquez., 2009. Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS Microbiology Review*, **33(3)**: 531-8.
- Dahanayake P.S., Hossain S., Wickramanayake M.V.K.S., Wimalasena S.H.M.P., & Heo G.J., 2020. Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) marketed in Korea as a source of *vibrio* harbouring virulence and β -lactam resistance genes. *Letters in applied microbiology*, **71(1)**:46-53.
- Das B., Verma J., Kumar P., Ghosh A., & Ramamurthy T., 2020. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*, **38 (1)**:A83-A92.
- Davies J., & Davies D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **74**: 417-433.
- Davis G. S., Waits K., Nordstrom L., Grande H., Weaver B., Papp K., Horwinski J., Koch B., Hungate B.A., Liu C.M & Price L.B., 2018. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. *BMC Microbiology*, **18**:174.
- de Campos A.C.L.P., Puño-Sarmiento J.J., Medeiros L.P., Gazal L.E.S., Maluta R.P., Navarro A., Kobayashi R.K.T., Fagan E.P & Nakazato G., 2018. Virulence Genes and

- Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Cheese Made from Unpasteurized Milk in Brazil. *Foodborne pathogens and disease*, **15(2)**:94-100.
- **De Jesús Cortés- Sánchez, A., Garcia-Barrientos, R., Minor- Pérez, H., Dublán-García, O. & Martin-Azocar ALS., 2017.** Food Safety and Anti- microbial Resistance an Approach to the Genus *Salmonella spp.* *Journal des Biosciences et des Médicaments*, **5**: 55-71.
 - **De Jong A., Stephan B., & Silley P., 2011.** Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* from healthy livestock and poultry in the EU. *Journal of Applied Microbiology*, **112(2)**:239-45
 - **De Oliveira D.M.P., Forde B.M., Kidd T.J., Harris P.N.A., Schembri M.A & Beatson S.A., 2020.** Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, **7**:173.
 - **De Vasconcelos Byrne V., Hofer E., Vallim D., C., & De Castro Almeida R., C., 2016.** Occurrence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*, **47(2)**:438-43.
 - **Ding J., An X.L., Lassen S.B., Wang H.T., Zhu D & Ke X., 2019.** Heavy metal-induced co-selection of antibiotic resistance genes in the gut microbiota of collembolans. *The Science of the Total Environment*, **683**: 210-215.
 - **Donaghy J.A., Danyluk M.D., Ross T., Krishna B., & Farber J., 2021.** Big Data Impacting Dynamic Food Safety Risk Management in the Food Chain. *Frontiers in Microbiology*, **12**: 668196.
 - **Dowling A., O'Dwyer J & Adley C., 2017.** Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. Antimicrobial research: *Novelbio knowledge and Educational Programs*, **1** :536-545.
 - **Dutta D., Kaushik A., Kumar D & Bag S., 2021.** Foodborne Pathogenic *Vibrios*: Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology*, **12**: 638331.
 - **Elbashir S., Parveen S., Schwarz J., Rippen T., Jahncke M & Depaola A., 2018.** Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review. *Food Microbiology*, **70**:85-93.
 - **Elkenany, R., Elsayed, MM & Zakaria., 2019.** Antimicrobial resistance profiles and virulence genotyping of *Salmonella enterica* serotypes recovered from broiler chickens and chicken carcasses in Egypt. *BMC Veterinary Research*, **15**: 124.
 - **Evans D.R., Griffith M.P., Sundermann A.J., Shutt K.A., Saul M.I., Mustapha M.M., Marsh J.M., Cooper V.S., Harisson L.H., Tyne D.V., 2020.** Systematic detection of horizontal gene transfer across genera among multidrug-resistant bacteria in a single hospital. *eLife*, **9**:e53886
 - **Faour-Klingbeil D., Kuri V., Fadlallah S & Matar G.M., 2016.** Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from raw vegetables in Lebanon. *Journal of Infection in Developing Countries*, **10(4)**:354-62.
 - **Fatica M.K & Schneider K.R., 2011.** *Salmonella* and produce: survival in the plant environment and implications in food safety, *Virulence*, **2(6)**:573-9.
 - **Fernández L & Hancock R.E.W., 2012.** Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **25(4)**:661-81.
 - **Foster T.J., 2017.** Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews*, **41(3)**:430-449
 - **Fung F., Wang H & Menon S., 2018.** Food safety in the 21st century (Review Article). *Biomedical journal*, **41 (2)**: 88-95.

- **Galhardo R. S., Hastings P. J & Rosenberg S. M., 2007.** Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **42(5)**: 399–435.
- **Giedraitienė A., Vitkauskienė A., Naginiene R & Pavilionis A., 2011.** Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*, **47(3)**:137-46.
- **Gil-Gil T., Ochoa-Sánchez L.E., Baquero F., & Martínez J.L., 2021.** Antibiotic resistance: Time of synthesis in a post-genomic age. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **19**: 3110–3124.
- **Hassan M.M., Begum S., Faruq A.A., Alam M., Mahmud T & Islam A., 2018.** Multidrug Resistant *Salmonella* Isolated from Street Foods in Chittagong, Bangladesh. *Microbiology Research Journal International*, **26 (6)**: 1-8.
- **Haubert L., Da Chunha C.E.P., Lopes G.V & da Silva W.P., 2018.** Food isolate *Listeria monocytogenes* harboring tetM gene plasmid-mediated exchangeable to *Enterococcus faecalis* on the surface of processed cheese. *Food Research International*, **107**:503-508.
- **Holvoet K., Sampers I., Callens B., Dewulf J., & Uyttendaele M., 2013.** Moderate Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Lettuce, Irrigation Water, and Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **79(21)**: 6677–6683.
- **Hölzel C.S., Tetens J.L & Schwaiger K., 2018.** Unraveling the Role of Vegetables in Spreading Antimicrobial-Resistant Bacteria: A Need for Quantitative Risk Assessment. *Foodborne Pathogens and Disease*, **15(11)**: 671–688.
- **Huddleston J.R., 2014.** Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and Drug Resistance*, **7**: 167–176.
- **Ieren I., Bello M & Kwaga J.K.P., 2013.** Occurrence and antibiotic resistance profile of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables and vegetable salads sold in Zaria, Nigeria. *African Journal of Food Science*, **7(9)** 334-338.
- **Iwu D.C., du Plessis E., Korsten L & Okho A.I., 2020.** The incidence of antibiotic resistance within and beyond the agricultural ecosystem: A concern for public health. *Microbiologyopen*, **9(9)** :e1035.
- **Iwu D.C., du Plessis E., Korsten L & Okho A.I., 2021.** Prevalence of *E.coli* O157 :H7 strains in irrigation water and agricultural soil in tow district municipalities in South Africa. *International Journal of Environmental Studies*, **78(3)**: 474-483.
- **Iwu, C. D., & Okoh, A. I. 2019.** Preharvest Transmission Routes of Fresh Produce Associated Bacterial Pathogens with Outbreak Potentials: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **16(22)**: 4407.
- **Jaffee S., Siegel P., & Andrews C., 2010.** Rapid Agricultural Supply Chain Risk Assessment: A Conceptual Framework. The World Bank. Washington. D.C.
- **Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. 2017.** Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology*, **123(3)**: 570–581.
- **Katz L et Baltz R.H., 2016.** Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **43(2-3)** :155-176.
- **Kim W. S., Morishita T. Y., & Dong F., 2021.** Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* between conventional and organic broiler flocks. *Journal of Applied Poultry Research*, **30 (2)**: 100158.
- **Knapp J., Laur GL., Vadas P.A., Weiss W.P & Tricarico J.M., 2014.** Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*, **97(6)**:3231-3261.

- Krause K.M., Serio A.W., Kane T.R., & Connolly L.E., 2016. Aminoglycosides: an Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **6(6)**: a027029.
- Kümmerer K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment –a review-part II. *Chemosphere*, **75 (4)**:435-441.
- Le Page G., Gunnarsson L., Snape J., Tyler C.R., 2017. Integrating human and environmental health in antibiotic risk assessment: A critical analysis of protection goals, species sensitivity and antimicrobial resistance. *Environment international*, **109**:155-169.
- Letchumanan V., Wong P-C., Goh B-H., Ming C.L., Pus-parajah P., Wong S.H., Ab Mutalib N-S. & Lee L.H., 2018. A review on the characteristics, taxonomy and prevalence of *Listeria monocytogenes*. *Progress in Microbiology and Molecular Biology*, **1(1)**: a0000007.
- Leungtongkam U., Thummeepark R., Tasanapak K & Sitthisak S., 2018. Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integron of *Actinobacter baumannii*. *PLoS ONE*, **13(12)**: e0208468.
- Li B., & Webster T.J., 2018. Bacteria Antibiotic Resistance: New Challenges and Opportunities for Implant-Associated Orthopaedic Infections. *Journal of Orthopaedic Research*, **36(1)**: 22–32.
- Li Y., Xie T., Pang R., Wu Q., Zhang J., Lei T., WuH., Wang J., Ding Y., Chen M., Wu. S., Zeng H., Zhang Y., Wei X., 2020. Food-borne *Vibrio parahaemolyticus* in China: Prevalence, antibiotic susceptibility, and genetic characterization. *Frontiers in microbiology*, **11**: 1670.
- Lima C.M., Souza I.E.G.L., Alves T.D.S., Leite C.C., Barreto N.S.E., & Almeida R.C.D., 2017. Antimicrobial resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* from ready-to-eat food. *Journal of Food Sciences and Technology*, **54(11)**:3612-3619.
- Looft T & Johnson T.A., Allen H.K., Bayles D.O., Alt D.P., Stedtfeld D.R., Sul J.W., Stedtfeld T.M., Chai B., Cole R.J., Hashsham S.A., Tiedje J.M & Stanton B.T., 2012. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109(5)**: 1691-1696.
- Lynch M. F., Tauxe R. V., & Hedberg, C. W., 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology and Infection*, **137 (3)**:307-315.
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. 2018. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: *Potential Public Health Implications*. *Molecules*, **23(4)**, 795.
- Martínez J.L., & Baquero F., 2014. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Upsala Journal of Medical Sciences*, **119(2)**:68-77.
- Martínez J.L., Coque T.M., & Baquero F., 2015. Prioritizing risks of antibiotic resistance genes in all metagenomes. *Nature Reviews Microbiology*, **13(6)**:396.
- Martinez J.L., Fajardo A., Garmendia L., Hernandez A., Linares J.F., Solano L.M., & Sánchez M.B., 2009. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, **33(1)**:44-65.
- Martniez J.L., & Baquero F., 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, **44(7)**: 1771–1777.
- Melnyk A.H., Wong A., & Kassen R., 2014. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evolutionary Applications*, **8(3)**: 273–283.
- Mohamed R.I., Abdelmonem M.A., & Amin H.M., 2018. Virulence and antimicrobial susceptibility profile of *Listeria monocytogenes* isolated from frozen vegetables available in the Egyptian market. *African Journal of Microbiology Research*, **12(9)**:218-224.

- **Mwanza F., Komba E.V.G., & Kambarage D.M., 2021.** Occurrence and Determination of Antimicrobial Resistant *Escherichia coli* Isolates in Fish and Vegetables as Indicator Organism of Faecal Contamination in Dar es Salaam, Tanzania. *International Journal of Microbiology*, **2021**: 6633488.
- **Na Phuket N.R., Siripornadulsil S., & Siripornadulsil W., 2019.** Prevalence of Antibiotic-resistant *Salmonella* in Vegetables and Fermented Foods and their Control by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **13 (4)**: 1929-1939.
- **Nadimpalli M., Delarocque A. E., Love D.C., Price L.B., Huynh B.T., Collard J.M., Lay K.S., Borand L., Ndir A., & Walsh T.R., 2018.** Combating Global Antibiotic Resistance: Emerging One Health Concerns in Lower- and Middle-Income Countries. *Clinical Infectious Diseases*, **66(6)**:963-969.
- **Nair D.V., Venkitanarayanan K & Johny A.K., 2018.** Antibiotic-Resistant *Salmonella* in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control. *Food Microbiology*, **7(10)** : 167.
- **NCEZID, 2019.** National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases.
- **Ndagi U., Falaki A.A., Abdullahi M., Lawal M.M., & Soliman M.E., 2020.** Antibiotic resistance: bioinformatics-based understanding as a functional strategy for drug design. *RSC Advances*, **10(31)**:18451–18468
- **Nesheim M.C, Oria M & Yih P.T., 2015.** A Framework for Assessing Effects of the Food System. *Washington, DC: The National Academies Press*, **(1)** : 31-80.
- **Odongo N.E., Bagg R., Dick M.M., Rashid Or., Hook S.E., Gray J.T., Kebreab E., France J & McBride B.W., 2007.** Long-Term Effects of Feeding Monensin on Methane Production in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, **4(90)**: 1781-1788.
- **Olaimat A.N., Al-Holy M A., Shahbaz H.M., Al-Nabulsi A.A., Abu Ghoush M.H., Osaili T.M., Ayyash M.M & Holley R.A., 2018.** Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products. *A Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, **5(17)** : 1277-1292.
- **Olaimat A.N & Holley R.A., 2012.** Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology* , **1(32)** : 1-19.
- **Pan C.Y., Huang., T.C., Wng Y.D., Yeh. Y.C., Hui C.F & Chen J.Y., 2012.** Oral administration of recombinant epinedidin-1 protected grouper (*Epinephelus coioides*) and zebrafish (*Danio rerio*) from *Vibrio vulnificus* infection and enhanced immunue. *Fish & Shellfish Immunology*, **32 (6)**: 947-957.
- **Partridge R.S., Kwong S.M, Firth N, & Jensen S.O., 2018.** Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Review*, **4(31)**: e00088-17.
- **Peterson E., & Kaur P., 2018.** Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, **9**:2928.
- **Phuket N, Siripornadulsil S & Siripornadulsil W, 2019.** Prevalence of Antibiotic-resistant *Salmonella* in Vegetables and Fermented Foods and their Control by Lactic Acid Bacteria, *J Pure Appl Microbiol*, **13(4)**: 1929-1939.
- **Pignata C., D'angelo D & Giorgio Gilli E.F., 2017.** A review on microbiological contamination of fresh produce with nonthermal plasma. *Journal of Applied Microbiology*, **122(6)** : 1438-1455.
- **Prescott, J. F. 2014.** The resistance tsunami, antimicrobial stewardship, and the golden age of microbiology. *Veterinary Microbiology*, **171(3-4)** : 273–278.

- **Rahman M.A., Rahman A.K.M.A., Islam M.A., Alam M.M., 2017.** Detection of multi-drug resistant Salmonella from milk and meat in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, **16(1)**: 115-120.
- **Rasmussen B.A., Bush K., Tally F.P., 1997.** Antimicrobial resistance in anaerobes. *Clinical Infectious Diseases*, **24(1)**:S110-S120.
- **Read A.F., & Woods R.J., 2014.** Antibiotic resistance management. *Evolution, Medicine, and Public Health*, **2014(1)**: 147.
- **Reygaert W.C., 2016.** Insights on the Antimicrobial Resistance Mechanisms of Bacteria. *Advances in Clinical and Medical Microbiology*, **2(1)**: ACMM-2-005.
- **Rosenberg S.M., 2001.** Evolving responsively: adaptive mutation. *Nature Reviews Genetics*, **2(7)**:504-15.
- **Rosenblatt-Farrell N., 2009.** The landscape of antibiotic resistance. *Environ Health Perspect*, **117(6)**: A244–A250.
- **Rushton J., 2015.** Anti-microbial Use in Animals: How to Assess the Trade-offs. *Zoonoses and Public Health*, **62(1)**: 10–21.
- **Santaji S & Indrawattan., 2016.** Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed research international*, **2016:2475067**.
- **Scharer K., Savios S., Cernela N., Saegesser G & Stephan R., 2011.** Occurrence of *Vibrio spp.* in Fish and Shellfish Collected from the Swiss Market. *Journal of Food Protection*, **74(8)**: 1345- 1347.
- **Sharma C., Rokana N., Chandra M., Singh B.p., Gulhane R.D., Singh Gill J.P., Ray P., Puniya A.K & Panwar H., 2018.** Antimicrobial resistance: its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. *Frontiers in Veterinary Science*, **4(237)**: 1.
- **Skandalis N., Maeusli M., Papafotis D., Miller S., Lee B., Theologidis L., & Luna B., 2021.** Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Antibiotics*, **10(6)**: 640.
- **Smith A., Moorhouse., Monaghan J., Taylor C & Singleton., 2018.** Outbreak of *Listeria monocytogenes* in south of Africa, 2017-2018: Laboratory activities and experiences associated with whole-genome sequencing analysis of isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*, **16(7)**: 524-529.
- **Sommer M.O.A., Munck C., Toft-Kehler R.V & Andersson D I., 2017.** Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nature Reviews Microbiology*, **15**: 689–696.
- **Song J., Oh S., Kim J & Shin J., 2020.** Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from raw vegetables in South Korea. *Scientific Report*, **10**: 19721.
- **Stringer M., 2005.** Food Safety Objectives – Role in Microbiological Food Safety Management. *Food control*, **16(9)**:775-830.
- **Sultan I., Rahman S., Jan T.A., Siddiqui T.M., Mondal H.A. & Haq R.M.Q., 2018.** Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *Frontiers in Microbiology*, **9**:2066.
- **Sun D., Jeannot K., Xiao Y., & Knapp C.W., 2019.** Editorial: Horizontal Gene Transfer Mediated Bacterial Antibiotic Resistance. *Frontiers in microbiology*, **10**: 1933.
- **Thung T.Y., Radu S., Mahyudin N.A., Rukayadi Y, Zakaria Z., Mazlan N., Tan B.H., Lee E., Yeoh S.L., Chin Y.Z., Tan C.W., Kuan C.H., Basri D.F., & Mohamed Radzi C.W.J., 2018.** Prevalence, Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Profiles of *Salmonella* Serovars from Retail Beef in Selangor, Malaysia. *Frontiers in Microbiology*, **(8)** : 2.

- **Toomey N, Monaghan N, Fanning S & Bolton D., 2009.** Transfer of Antibiotic Resistance Marker Genes between Lactic Acid Bacteria in Model Rumen and Plant Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **75(10)**: 3146–3152.
- **Tsigalou C., Konstantinidis T., Stavropoulou E., Bezirtzoglou E.E & Tsakris A., 2020.** Potential elimination of human gut resistome by exploiting the benefits of functional foods. *Frontiers in Microbiology*, **11(50)**: 2.
- **Uche F.I., Guo X., Okokon J., Ullah I., Horrocks P., Boateng J., Huang C., & Li W.W., 2021.** In Vivo Efficacy and Metabolism of the Antimalarial Cycleanine and Improved In Vitro Antiplasmodial Activity of Semisynthetic Analogues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **65(2)**:e01995-20
- **Van Boeckel T.P., Gandra S., Ashok A., Caudron Q., Grenfell B.T., Levin S.A., Laxminarayan R., 2014.** Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, **14(8)**:742-750.
- **Verraes C., Van Boxtael S., Van Meervenne E, Van Coillie E., Butaye P., Catry B., de Schaezen 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.
- **Vettoretti L., Plésiat P., Muller C., El Garch F., Phan G., Attrée I., Ducruix A., & Llanes C., 2009.** Efflux unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cysticfibrosis patients. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, **53(5)**:1987-97.
- **Von Wintersdorff C.J.H., Panders J., Nijkerk J.V.M., Mills N.D., Majumder S., Alphen L.B.V., Savelkoul P.H.M., & Wolffs P.F.G., 2016.** Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in microbiology*, **7**: 173.
- **Wadamori Y., Fam J., Hussain M.A., Gooneratne R., & Yildiz F., 2016.** Microbiological risk assessment and antibiotic resistance profiling of fresh produce from different soil enrichment systems: A preliminary study. *Cogent Food & Agriculture*, **(1)**:1274281.
- **Walsh C., Duffy G., Nally P., O'Mahony R., McDowell D.A & Fanning S., 2008.** Transfer of ampicillin resistance from *Salmonella Typhimurium* DT104 to *Escherichia coli* K12 in food. *Letters in Applied Microbiology*, **46(2)**:210-5.
- **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. *International Office of Epizootics*, **31(1)**:249-260.
- **Wright G.D., 2006.** Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57(10)**:1451-70.
- **Yeats C., Finn R. D., & Bateman A., 2002.** The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends in Biochemical Sciences*, **27(9)**: 438-440.
- **Yeni F., Yavaş., Alpas H., & Soyer Y., 2016.** Most Common Foodborne Pathogens and Mycotoxins on Fresh Produce: A Review of Recent Outbreaks. *Critical Reviews in Food Sciences Nutrition*, **56(9)**:1532-44.
- **Yoke-kqueen C., Learn-Han L., Noorzaleha A.S., Son R., Sabrina S., Jiun-Horng S., & Chai-Hoon., 2008.** Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* isolated from indigenous vegetables and poultry in Malaysia. *Letters in Applied in Microbiolog*, **46(3)**:318-24.

- **Zhou CS, Wu J-W., Dong L-L., Liu B-F., Xing D-F., Yang S.S., Wu W.K., Fan J-N., Fe,g L-P., Cao G-L., 2020.** Removal of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance gene in wastewater effluent by UV-activated persulfate. *Elsevier*, **388**: 122070.
- **Zwanzin M., Harrison E., Brockhurst M., Hall J.P.J., Berendonk T.I., Berger U., 2019.** Mobile Compensatory Mutation Promote Plasmid Survival. *Ecological and Evolution Science*, **4(1)**:e00186-18.