

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République algérienne démocratique et populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
جامعة 8 ماي 1945 قالمة  
Université 8 mai 1945 Guelma  
Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers



## Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Spécialité/Option : Production et transformation laitière  
Département : Ecologie et Génie de l'Environnement

---

# Étude des risques d'antibiorésistance relatifs à l'industrie laitière : cas des fromages

---

Présenté par : M<sup>elle</sup> kharoubi hanane

Le : 20 juin 2017

Devant la commission composée de :

|                           |                     |                      |
|---------------------------|---------------------|----------------------|
| Pr Chemmam M              | <i>Président</i>    | Université de Guelma |
| M <sup>me</sup> Slimani A | <i>Examinatrice</i> | Université de Guelma |
| M <sup>me</sup> Leksir C  | <i>Encadreur</i>    | Université de Guelma |
| Pr Benyounes A            | <i>Membre</i>       | Université de Guelma |
| Dr Boussbiaa A            | <i>Membre</i>       | Université de Guelma |
| Dr Oumedour AK            | <i>Membre</i>       | Université de Guelma |

Année universitaire :2016-2017

## Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon encadreur de mémoire madame Leksir Choubaila. je la remercie de m'avoir encadré, orienté et conseillé.

Mes remerciements sont adressés également aux membres du Jury qui ont pris sur leur temps et ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail :

Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect à Mr Chemmam qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury malgré toutes ses responsabilités et ses nombreuses occupations. Je vous remercie pour votre modestie mais aussi pour votre partage du savoir. Vous trouvez ici toutes mes expressions respectueuses et ma profonde gratitude.

Je remercie vivement madame Slimani d'avoir eu l'amabilité de bien vouloir examiner ce travail, mais aussi pour tous ses efforts avec nous tout au long de notre cursus SPA, PTL. Veuillez trouver ici toutes mes expressions de respect et de gratitude.

j'adresse mes sincères remerciements à tous les enseignants intervenants dans les parcours SPA et PTL et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté de me rencontrer et répondre à mes questions durant mes recherches.

je remercie mes très chers parents, qui ont toujours été là pour moi, « vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. je suis redevable d'une éducation dont je suis fier ».

---

---

## Sommaire

---

---

Liste des abreviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Introduction .....01

### CHAPITRE I :GENERALITE SUR LES ANTIBIOTIQUES.

I.1.Définition ..... 04

I.2 .Histoire des antibiotiques.....04

I.3. Liste des antibiotiques.....05

I.4. Mode d'action.....05

    I.4.1 Action sur la paroi bactérienne.....05

    I.4.2. Action sur la structure de la membrane.....06

    I.4.3. Action sur la synthèse protéique.....06

    I.4.4. Action sur la synthèse de l'ADN.....06

I.5. Classification des antibiotiques.....07

I.5.1.Antibiotiques Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglucane.....08

    I.5.1.1.  $\beta$ -lactamines.....08

        I.5.1.1.1. Pénicillines.....09

        I.5.1.1.2. Carbapénèmes.....10

        I.5.1.1.3. Céphalosporines.....10

        I.5.1.1.4. Monobactames.....11

        I.5.1.1.2.Mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines.....12

I.5.2.Inhibiteurs de la synthèse des protéines.....13

    I.5.2.1. Aminosides.....13

        I.5.2.1.1. Définition.....13

        I.5.2.1.2. Mode d'action.....13

I.5.3.Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires.....14

I.5.3.1.polymixines.....14

I.5.4.Inhibiteurs des acides nucléiques.....14

|  |    |
|--|----|
| <b>I.5.4 .1.Rifamycines</b> .....  | 14 |
| <b>I.5.4.2 .Quinolones</b> .....   | 14 |
| <b>I.5.5.Inhibiteurs de la synthèse des folates</b> .....                              | 14 |
| <b>I.5.5.1.Sulfamide</b> .....   | 14 |
| <b>I.5.5.2.Triméthopri</b> me.....   | 15 |
| <b>I.6. Antibiotiques utilisés en élevage</b> .....                                    | 15 |
| <b>1.6.1. Antibiotiques facteurs de croissance</b> .....                               | 15 |
| <b>1.6.2. Antibiotiques vétérinaires</b> .....   | 15 |
| <b>I.7. Résidus d’antibiotiques</b> .....  | 16 |
| <b>I.7.1. Définition de résidu</b> .....   | 16 |
| <b>I.7.2. Relation entre résidus d’antibiotiques et résistances bactériennes</b> ..... | 16 |
| <b>I.7.3 .Problèmes causés par la présence des résidus d'antibiotiques</b> .....       | 17 |
| <b>I.7.3.1. Problèmes sanitaires</b> .....   | 18 |
| <b>I.7.3.2 .Problèmes technologiques</b> .....   | 20 |

## **CHAPITRE II : RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES**

|  |    |
|--|----|
| <b>II.1. Introduction</b> .....  | 22 |
| <b>II.2. Définition</b> .....  | 22 |
| <b>II.3. Origines de la resistance aux antibiotiques</b> .....                   | 22 |
| <b>II.4. Mécanismes de la résistances</b> .....                                  | 23 |
| <b>II.4.1. Résistance naturelle</b> .....  | 23 |
| <b>II.4.2 .Résistance acquise</b> .....  | 24 |
| <b>II.4.2.1. Mutation chromosomique (évolution verticale)</b> .....              | 25 |
| <b>II.4.2.2. Acquisition de gène de résistance (évolution horizontale)</b> ..... | 25 |
| <b>II.4.3. Résistance croisée et Co-résistance</b> .....                         | 27 |
| <b>II.5 .Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques</b> .....    | 27 |
| <b>II.6. Diffusion des bactéries résistantes entre l’animal et l’Homme</b> ..... | 29 |
| <b>II.7. Evaluation de l’antibiorésistance</b> .....                             | 33 |
| <b>II.7.1. Méthode par dilution</b> .....  | 33 |
| <b>II.7.2. Méthode par diffusion en milieu solide</b> .....                      | 34 |
| <b>II.7.3. Etablissement de la courbe de concordance</b> .....                   | 35 |
| <b>II.8. La lutte mondiale contre l’antibiorésistance</b> .....                  | 36 |

## **CHAPITRE III : RISQUE DE L'ANTIBIORESISTANCE DANS L'INDUSTRIE LAITIERE**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>III.1.</b> Définition.....   | <b>38</b> |
| <b>III.2.</b> Produits de l'industrie laitiere.....   | <b>38</b> |
| <b>III.3.</b> Généralités sur le Lait.....  | <b>38</b> |
| <b>III.3.1.</b> Définition du Lait.....   | <b>38</b> |
| <b>III.3.2.</b> Transformation de lait.....   | <b>39</b> |
| <b>III.3.3.</b> Microorganismes dans le lait.....   | <b>40</b> |
| <b>III.3.3.1.</b> Flore originelle.....   | <b>40</b> |
| <b>III.3.3.2 .</b> Flore de contamination.....  | <b>41</b> |
| <b>III.3.3.3.</b> Flore lactiques .....   | <b>42</b> |
| <b>III.4 .</b> Généralités sur les bactéries lactiques.....   | <b>42</b> |
| <b>III.4.1.</b> Classification et taxonomie.....  | <b>43</b> |
| <b>III.4.2.</b> Habitat et origine des bactéries lactiques.....   | <b>45</b> |
| <b>III.4.3.</b> Utilisation industrielle des bactéries lactiques.....   | <b>45</b> |
| <b>III.4.4.</b> Problème de l'antibiorésistance chez les bactéries lactiques.....                                 | <b>46</b> |
| <b>III.4.5 .</b> Acquisition et diffusion de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries<br>Lactiques..... | <b>49</b> |
| <b>III.4.5.1 .</b> Modifications spontanées du génome des bactéries lactiques.....                                | <b>49</b> |
| <b>III.4.5.1.1.</b> Chromosome des bactéries lactiques.....   | <b>49</b> |
| <b>III.4.5.1.2 .</b> Eléments génétiques mobiles.....   | <b>50</b> |

## **CHAPITRE IV : RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DANS LES PRODUITS DE FROMAGE**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>IV.1.</b> Introduction.....  | <b>54</b> |
| <b>IV.2 .</b> Fromages.....   | <b>54</b> |
| <b>IV.2.1.</b> Définition.....  | <b>54</b> |
| <b>IV.2 .2 .</b> Principales étapes de la fabrication des fromages..... | <b>55</b> |
| <b>IV.2.2.1 .</b> Coagulation du lait.....                              | <b>56</b> |
| <b>IV.2.2.2.</b> Egouttage.....   | <b>57</b> |
| <b>IV.2.2.3.</b> Salage.....  | <b>57</b> |
| <b>IV.2.2.4 .</b> Affinage des fromages.....                            | <b>57</b> |
| <b>IV.3.</b> Agents d'affinage des fromages.....                        | <b>58</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>IV.3.1. Microorganismes d'affinage.....</b>   | <b>58</b> |
| <b>IV.4. Contamination des fromage par des microorganismes résistants aux antibiotiques pendant les stades de fabrication et la dynamiques microbiennes.....</b> | <b>60</b> |
| <b>IV-4-1. Contamination au stade de pasteurisation.....</b>   | <b>60</b> |
| <b>IV-4-2 .Contamination au niveau de la culture initiale.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>IV-4-3 .Contamination au stade de coagulation.....</b>  | <b>62</b> |
| <b>IV-4-4. Contamination au stade de l'affinage.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>IV.5. Utilisation des ferments lactiques résistants aux antibiotiques dans la fabrication de fromage</b>  |           |
| .....  | <b>64</b> |
| <b>IV.5.1. Définition des ferments lactiques.....</b>  | <b>64</b> |
| <b>IV.5.2. Types de ferments lactiques.....</b>  | <b>65</b> |
| <b>IV.5.2.1. Selon la composition.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>IV.5.2.2. Selon la température de croissance.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>IV.5.3 .Profils de résistance aux antibiotiques des bactéries lactiques.....</b>  | <b>66</b> |
| <b>IV.5.3.1. <i>Lactobacillus</i>.....</b>   | <b>68</b> |
| <b>IV.5.3.2. <i>Lactococcus</i>.....</b>   | <b>69</b> |
| <b>IV.5.3.3 .<i>Streptococcus thermophiles</i>.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>IV.5.3.4. <i>Leuconostoc</i>.....</b>   | <b>70</b> |
| <b>IV.6. Cause possible pour la résistance aux antibiotiques dans le fromage.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>IV.7. Conséquences possibles de la résistance aux antibiotiques dans le fromage et les denrées alimentaires.....</b>  | <b>71</b> |
| <b>IV.8. Prévention contre la contamination de fromage par des microorganismes qui peuvent être résistants aux antibiotiques.....</b>                            | <b>71</b> |
| <b>IV.8.1 . Guide des bonnes pratiques d'hygiène.....</b>  | <b>71</b> |
| <b>IV.8.2. Méthode HACCP.....</b>  | <b>72</b> |
| <b>IV.8.3. Chaîne du froid.....</b>  | <b>72</b> |
| <b>IV.8.4. Contrôle des cheptels.....</b>  | <b>73</b> |
| <b>IV.8.5. Contrôles sur la chaîne de production.....</b>  | <b>73</b> |
| <b>Conclusion.....</b>   | <b>75</b> |

**Références bibliographiques.....77**

**Annexes**

---



---

## Liste des abréviations

---



---

|  |  |
|--|--|
| <p>➤ <b>Noms de genres bactériens</b></p> <p>B. : <i>Bacillus</i></p> <p>Bf. : <i>Bifidobacterium</i></p> <p>E. : <i>Escherichia</i></p> <p>En. : <i>Enterococcus</i></p> <p>L. : <i>Listeria</i></p> <p>Lb. : <i>Lactobacillus</i></p> <p>Lc. : <i>Lactococcus</i></p> <p>Ln. : <i>Leuconostoc</i></p> <p>P. : <i>Pediococcus</i></p> <p>S. : <i>Staphylococcus</i></p> <p>St. : <i>Streptococcus</i></p> <p>➤ <b>Unités de mesures</b></p> <p>°C : Degré Celsius</p> <p>°D : Degré dornic</p> <p>cm, mm, nm : Centimètre, millimètre, nanomètre</p> <p>g, mg : Gramme, milligramme</p> <p>h, min, s : heure, minute, seconde</p> <p>l, ml, µl : Litre, millilitre, microlitre</p> <p>M, mM : Molaire, millimolaire</p> <p>N : Normalité</p> <p>U : Unité</p> <p>UI : Unité International</p> | <p>➤ <b>Autres abréviations</b></p> <p>ADH : Arginine Dihydrolase</p> <p>ADN : Acide Désoxyribonucléique</p> <p>ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique</p> <p>BAL : Bactéries d'acide lactique</p> <p>CA : Comité de l'antibiogramme</p> <p>CMI : Concentration minimale inhibitrice</p> <p>FAO : Food and Agriculture Organization</p> <p>IS: Séquences d'insertion</p> <p>NSLAB: Non-sterters lactic acide bacteria</p> <p>OMS : L'Organisation mondiale de la santé</p> <p>PAB : Para-amino benzoïque</p> <p>pH : Potentiel d'Hydrogène</p> <p>R : Résistante</p> <p>SARM : <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la Méthicilline</p> <p>S : Sensible</p> <p>SFM : Société française de microbiologie</p> <p>sp. : Espèce non précisée</p> <p>ssp. : Sous espèce</p> <p>TB-MR : Tuberculose multirésistante</p> <p>THG : Transfert horizontal de gène</p> <p>Tn : Transposons</p> <p>UFC : Unité formant colonie</p> |
|--|--|

---



## Liste des figures

| <b>Figure N° :</b>   | <b>page :</b> |
|--|---------------|
| <b>Figure 1 :</b> Cibles des principaux antibiotiques  | 7             |
| <b>Figure 2 :</b> Structures de quelques $\beta$ -lactamines   | 9             |
| <b>Figure 3 :</b> Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines   | 13            |
| <b>Figure 4 :</b> Les trois mécanismes de transfert génétique  | 27            |
| <b>Figure 5:</b> Schéma illustrant le développement de la résistance aux antibiotiques   | 28            |
| <b>Figure 6 :</b> Voies possibles de la transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques origines animales aux humains.                         | 32            |
| <b>Figure 7:</b> Exemple de la détermination de la CMI par la méthode des dilutions sériées.   | 34            |
| <b>Figure 8 :</b> Exemple de gélose avec des disques d'antibiotiques et une souche bactérienne ayant une sensibilité variable aux antibiotiques testés | 35            |
| <b>Figure 9 :</b> Exemple de courbe de concordance avec détermination des diamètres discriminants à partir des CMI discriminantes.                     | 36            |
| <b>Figure 10 :</b> Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S           | 44            |
| <b>Figure 11</b> <i>Pediococcus lactis</i> au microscope Electronique  | 48            |
| <b>figure 12 :</b> <i>Lactococcus lactis subsp</i> au microscope électronique  | 48            |
| <b>Figure 13 :</b> <i>Lactobacillus acidophilus</i> au microscope électronique   | 48            |
| <b>figure 14:</b> <i>Bifidobacterium bifidum</i> au microscope électronique  | 48            |
| <b>Figure 15 :</b> Voies principales de contamination de fromage par des microorganismes résistants aux antibiotiques                                  | 64            |
| <b>Figure 16 :</b> Diagramme de fabrication, points critiques pour la maîtrise   | 74            |

---

## Liste des tableaux

| <b>Tableau N°</b>  | <b>page :</b> |
|--|---------------|
| <b>Tableau 1 :</b> Taux d'inhibitions de levains lactiques par quelques antibiotiques  | <b>21</b>     |
| <b>Tableau 2 :</b> Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques  | <b>29</b>     |
| <b>Tableau 3 :</b> Variation de la composition du lait d'une espèce animale à une autre,<br>le tableau suivant donne la composition chimique des différents mammifères | <b>39</b>     |
| <b>Tableau 4 :</b> Caractéristiques physico-chimiques du lait  | <b>39</b>     |
| <b>Tableau 5 :</b> Flore originelle du lait cru  | <b>41</b>     |
| <b>Tableau 6 :</b> Principaux produits issus de la fermentation des bactéries  | <b>36</b>     |
| <b>Tableau 7 :</b> Classification des fromages en fonction de la consistance, de<br>la teneur en matière grasse et des principales caractéristiques d'affinage         | <b>55</b>     |
| <b>Tableau 8 :</b> Principales bactéries lactiques utilisés en technologie fromagère   | <b>66</b>     |
| <b>Tableau 9 :</b> Concentrations minimales inhibitrices pour la sélection<br>des bactéries lactiques  | <b>68</b>     |

## Liste des annexes

| <b>Annexe N° :</b>   | <b>page :</b> |
|--|---------------|
| <b>Annexe 1 :</b> Laits collectés et/ou destinés a la transformation Règlement (CE)<br>n° 853/2004 du 29 avril | <b>i</b>      |
| <b>Annexe 2 :</b> Séquences d'insertion (IS)   | <b>i</b>      |
| <b>Annexe 3 :</b> Structure bactérienne  | <b>ii</b>     |
| <b>Annexe 4 :</b> Principales transformations des composants du lait lors de<br>la préparation du fromage      | <b>ii</b>     |
| <b>Annexe 5 :</b> Résistance naturelle des bactéries à la pénicilline  | <b>iii</b>    |

# ***Introduction***

## Introduction

Depuis la découverte des antibiotiques, ils ont été universellement utilisés dans le traitement des infections bactériennes. Cependant, l'utilisation abusive d'antibiotiques, comme prescrire des antibiotiques pour une infection non bactérienne, est également un phénomène courant. En outre, les antibiotiques sont largement utilisés chez les animaux, aussi bien en médecine vétérinaire et en élevage agricole (**Teuber, 2001**). Dans la production d'aliments de bétails, les antibiotiques sont utilisés non seulement pour traiter les maladies, mais aussi pour contrôler la propagation de la maladie, prévenir les maladies et promouvoir la croissance des animaux. Quand les antibiotiques sont utilisés comme stimulateurs de croissance, ils sont fournis à des doses faibles pendant une période prolongée de temps dans les grands groupes d'animaux. L'émergence rapide de la résistance aux antibiotiques est une conséquence de l'utilisation abusive d'antibiotiques. La résistance aux antibiotiques constitue une menace majeure de la santé publique en raison des difficultés qu'il crée dans le traitement des infections bactériennes, en particulier les infections nosocomiales chez les patients immunodéprimés. Nous sommes confrontés à un gros problème qu'aucun antibiotique disponible ne peut être utilisé pour effectivement contrôler les infections nosocomiales causées par des bactéries résistantes à plusieurs médicaments, tels que les entérocoques, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* (**Airs et Murray, 2009**). L'émergence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) est un autre exemple des préoccupations. À ce jour, 30 à 50 % des isolats envahissants de l'hôpital de *S. aureus* sont SARM. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime également qu'environ 440 000 nouveaux cas de tuberculose multirésistante (TB-MR) émergent chaque année, qui a fait au moins 150 000 morts, ces décès coûteraient le monde, jusqu'à 100 milliards de dollars d'ici à 2050 qui est un énorme fardeau économique (**Levy et Marshall, 2004**). Par conséquent, le contrôle de la propagation de l'antibiorésistance est une priorité pour nombreuses organisations telles que l'OMS, les instituts nationaux de la santé...ect.

L'utilisation irrationnelle et inappropriée d'antibiotiques a été inculpée comme une cause de la résistance aux antibiotiques à cause de la pression de sélection qu'il crée dans l'ensemble de l'écosystème. Pour enrayer plus la propagation de l'antibiorésistance, l'Union européenne interdit l'utilisation des antibiotiques comme stimulateurs de croissance dans l'agriculture (**Larson, 2007**). L'antibiorésistance chez les agents pathogènes opportunistes qui causent des infections nosocomiales a été largement étudiée en raison de son impact dramatique sur la santé des patients et des coûts des soins de la santé, Toutefois, des études récentes ont

identifié la résistance aux antibiotiques au-delà des confins d'hôpitaux et la documenté dans les deux la chaîne alimentaire et de l'environnement (**Wang et al., 2006; Allen et al., 2010; Devirgiliis et al., 2010; Li & Wang, 2010; O'Connor et al., 2010**)

La chaîne alimentaire est devenue essentielle pour la propagation de l'antibiorésistance en raison de ses multiples facettes connections avec l'ensemble de l'écosystème. Parmi toutes les bactéries d'origine alimentaire, les agents pathogènes d'origine alimentaire ont gagné le plus d'attention, la pathogénie et la résistance aux antibiotiques ont été intensivement étudiés.

Les Pathogènes d'origine alimentaire résistants aux antibiotiques constituent une menace pour la santé publique, ils sont un petit pourcentage des bactéries totales ingérées avec notre alimentation. D'un autre côté, les bactéries commensales sont les microbes d'origine alimentaire majeur dans le système alimentaire et les données ont montré que le pool génique de l'antibiorésistance est courant chez les bactéries commensales d'origine alimentaire (**Wang et al.2006**). Jusqu'à  $10^7$  UFC des bactéries résistantes aux antibiotiques par gramme de nourriture ont été détectés dans divers produits de vente au détail, y compris de nombreux produits de fruits de mer, produits laitiers, viande et produits prêt-à-consommer, Plus important encore, les gènes de l'antibiorésistance à partir d'isolats alimentaire représentative étaient transmissibles et fonctionnelles chez les bactéries pathogènes et résidentiels humaines par transfert horizontal de gène (THG). Puisqu'il n'y a aucune barrière génétique entre les bactéries commensales et pathogènes dans les aliments, systèmes hôtes et l'environnement naturel, la transmission des RA entre ces bactéries via THG est une préoccupation majeure qui pourrait conduire à la diffusion accélérée de l'antibiorésistance dans l'ensemble de l'écosystème.

Les Produits laitiers fermentés, surtout fromages, sont des aliments populaires qui sont consommés régulièrement dans de nombreux pays. Le fromage est généralement considéré comme un produit sain en raison de sa densité nutritionnelle. Toutefois, les fromages ont été trouvés pour transporter des concentrations élevées de bactéries résistantes aux antibiotiques. Ces dernières années, de nombreuses études sur l'antibiorésistance dans les fromages, fromages de spécialité locale en particulier dans des pays différents, ont été documentés, et la plupart des isolats résistants aux antibiotiques sont des bactéries d'acide lactique (BAL), y compris *Enterococcus* spp, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* spp. et *Leuconostoc* spp. (**Florez et al., 2005; Rizzotti et al., 2009**), Quelques autres bactéries commensales dont *Staphylococcus aureus* et entérobactéries ont également été

défectés (**Hammad *et al.*, 2009 ; Rosengren *et al.*, 2010**). Même si l'antibiorésistance dans le fromage ne provoque pas des problèmes immédiats sur la santé chez les humains, l'impact potentiel sur la santé publique en raison de THG est une préoccupation

La Fabrication du fromage est un processus compliqué. Nombreux ingrédients et étapes du processus peuvent potentiellement contribuer au développement de l'antibiorésistance dans les produits de fromage, y compris le lait, la culture de départ, pasteurisation, coagulation, salage et affinage. Par conséquent, il est important d'identifier les points critiques à maîtriser pour l'atténuation de l'antibiorésistance dans la fermentation du fromage, Étant donné le faible niveau de contamination sporadique des bactéries résistantes aux antibiotiques peut toujours arriver, il est également nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires chez les bactéries résistantes aux antibiotiques qui contribuent à la persistance et la diffusion de l'antibiorésistance . Une bonne compréhension des mécanismes moléculaires impliqués permettrait l'élaboration de stratégies ciblées qui minimiserait la contamination de l'antibiorésistance, la diffusion et de la persistance dans la chaîne alimentaire et de fromage (**Florez *et al.*, 2005**).

L'Algérie, étant un pays fortement dépendant des importations alimentaires, est particulièrement vulnérable aux risques liés aux microorganismes destinés à la consommation humaine, notamment les ferments lactiques. Parmi ces risques, l'émergence de la résistance aux antibiotiques, notamment dans la flore pathogène, ne cesse de susciter un intérêt croissant dans la communauté scientifique. Cependant, ce risque pourrait s'avérer plus important dans la flore considérée bénigne puisque les éléments génétiques responsables de résistance aux antibiotiques, en particulier ceux contenant des éléments mobiles, peuvent se déplacer rapidement chez les populations humaines et animales. Notre présent travail vise à évaluer les risques liées à l'antibiorésistance et les repercussions sur l'industrie laitière et la santé humaine.

# ***Chapitre I***

## **Chapitre I : Généralités sur les antibiotiques**

### **I-1 Définition**

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou synthétisée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe (**Gogny et al., 2001**). Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie, sans être détruit ni être modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne (**Ogwara, 1981**).

### **I-2 Histoire des antibiotiques**

En 1889, Paul Vuillemin introduit le terme "antibiose" pour décrire le principe actif d'un organisme vivant qui détruit la vie des autres pour protéger sa propre vie. En 1897, Ernest Duchesne envisagea de faire une activité de moisissures à des fins thérapeutiques, mais son idée ne se mettra en place qu'au XX<sup>ème</sup> siècle à la suite de la découverte de Sir Alexander Fleming. En 1929, il remarque qu'une de ses cultures de staphylocoques est en partie décimée : les bactéries ont été contaminées par la moisissure *Penicillium notatum*. Il constate aussi qu'elles ne se développent plus là où la moisissure prolifère.

Il formule alors l'hypothèse que cette-dernière synthétise une substance, la pénicilline, qui bloque le développement de la bactérie. Il essaye alors d'extraire le principe actif des moisissures, mais toutes ses tentatives se soldent par des échecs. (**Ogwara, 1981**)

Dix ans plus tard, le biochimiste américain René Dubos isole le premier antibiotique : la gramicidine. Celle-ci, produite par des bactéries du sol, tue les pneumocoques. Pourtant, ce premier antibiotique reste extrêmement difficile à purifier et hautement toxique.

En 1940, deux hommes cultivent une souche de *Penicillium* et parviennent à isoler et à purifier un peu de pénicilline G. Après les premiers essais chez des souris infectées où le résultat a été concluant, on administre cette substance à un policier atteint d'une septicémie. L'état du malade s'améliore, mais le stock de pénicilline étant insuffisant, le traitement doit être suspendu. Le policier décède donc, faute de quantité suffisante d'antibiotique.

Pourtant, le premier antibiotique synthétisé a été créé par Gerhard Domagk, un biochimiste allemand. En 1932, il a découvert qu'un colorant, le sulfamidochrysoïdine avait un effet sur les streptocoques. Il l'a alors tout de suite breveté sous le nom de Prontosil. Il a



d'ailleurs reçu le Prix Nobel pour sa découverte en 1939. En découvrant l'hémisynthèse, il a ouvert la voie à la antibiothérapie moderne. (**Gogny et al., 2001**).

### **I-3 Liste des antibiotiques**

De nos jours, on compte environ 10000 antibiotiques. Pourtant, seulement une centaine sont utilisés chez l'homme. On ne peut pas tous les utiliser, car certains sont toxiques pour les tissus humains, ou encore pas assez actifs / efficaces, certains sont instables chimiquement ou insolubles.

De plus, les antibiotiques sont classés selon leur structure chimique : il y a une quinzaine de familles. (**Ogwara, 1981**).

Les principales sont :

- bêta-lactamines ( pénicillines, céphalosporines)
- les macrolides
- les aminosides
- les sulfamides
- les imidazoles
- les tétracyclines
- les glycopeptides,
- les quinolones.

### **I-4 Mode d'action**

On considère les antibiotiques comme le groupe le plus important de médicaments pour la médecine. À côté de leurs propriétés de lutter contre les infections humaines dues aux bactéries pathogènes, ils sont également utilisés en médecine vétérinaire (**Emmanuel, 2003**). Les antibiotiques agissent à un niveau précis dans les structures bactériennes et chaque famille possède son site d'action propre (figure 01).

#### **I-4-1 Action sur la paroi bactérienne**

Bacitracine, Pénicilline, Céphalosporines agissent sur les germes en croissance inhibent la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité, se qui lui permet de résisté à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) (**Zeba, 2005**). Or, la pénicilline est un antibiotique qui empêche la synthèse de peptidoglycane ; par conséquent, la paroi cellulaire

est grandement affaiblie, et la cellule finit par la lyse. Puisque la pénicilline agit seulement sur les cellules en croissance active (**Emmanuel, 2003**).

#### **I-4-2 Action sur la structure de la membrane**

en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échange électrolytique avec le milieu extérieur (**Flandrois et al., 1997**).

#### **I-4-3 Action sur la synthèse protéique**

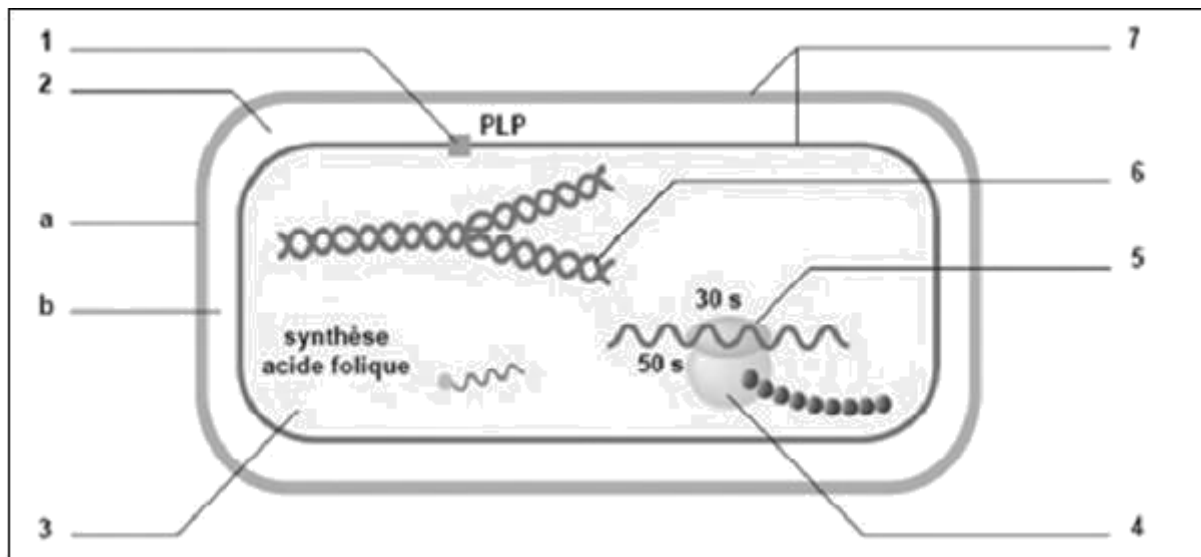
sur les ribosomes, ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéine anormale. Les aminoglycosides ou aminosides (Streptomycine, gentamycine, amikacine), empêchent la traduction de l'ARNm en se fixant sur la petite sous-unité des ribosomes (**Hermann, 2005**). Les phénicolés (chloramphénicol, thiamphénicol) bloquent la formation de la liaison peptidique sur la grosse sous-unité du ribosome bactérien. Les cyclines (tétracycline, doxycycline) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique en se fixant sur la petite sous-unité (**Flandrois et al., 1997**) les macrolides et les kétolides (érythromycine, azithromycine) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique (**Nilius et Ma, 2002**). La puromycine copie l'extrémité d'un ARNt, prend sa place dans le ribosome et bloque l'élongation de la chaîne peptidique.

#### **I-4-4 Action sur la synthèse de l'ADN**

certaines familles d'antibiotiques empêchent la réplication d'ADN en bloquant la progression de l'ADN polymérase. L'actinomycine bloque la progression de l'ARN polymérase. Les sulfamides provoquent une inhibition de la synthèse des bases nucléiques et la cellule meurt par carence en bases nucléiques (**Flandrois et al., 1997**), les quinolones et les fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase (**Chopra, 1998**).

#### **Autre :**

en agissant tant qu'antimétabolites bactériens (c'est-à-dire au niveau des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries), par exemple ; agit sur le métabolisme de l'acide folique .



**Figure N°01 :Cibles des principaux antibiotiques (Benmouden et Hakkou, 2007).**

a .Paroi bactérienne ; b. Espace périplasmique ; 1.  $\beta$ -lactamine (PLP) ; 2. Glycopeptides (Dala); 3. Dihydroptérorate synthétase (sulfamides) ; 4. Fixation à la sous-unité 50 S du ribosome (macrolides, synergistines, lincosamides, phénicolés) ; 5. Fixation à la sous-unité 30 S du ribosome (aminosides, tétracyclines) ; 6. Acides nucléiques (quinolones, rifamycines, nitroimidazolés) ; 7. Membranes cytoplasmiques (polymyxines).

### I-5 Classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques peut se faire selon : (Emmanuel, 2003)

- **L'origine** : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)
- **Mode d'action** : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques
- **Spectre d'activité** : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large )
- **Nature chimique** : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse.

La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles ( $\beta$  lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.)

Nous adopterons la classification selon le mode d'action

## **I-5-1 Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglucane $\beta$**

lactamines, glycopeptides et fosfomycine.

### **I-5-1-1 $\beta$ -lactamines**

#### **a- Généralités**

- Les  $\beta$ -lactamines ont un effet bactéricide sur les bactéries en voie de croissance, et considéré comme la famille la plus fréquemment utilisée dans le monde car :
  - les  $\beta$ -lactamines ont un large spectre antibactérien
  - il existe de nombreuses variétés de  $\beta$ -lactamines, ayant toutes en commun le cycle  $\beta$ -lactame
  - Cette famille caractérisé par leur faible toxicité et le vaste choix de molécules disponibles (**Ferech et Coenen. 2006 ; Livermore. 1995** ).
  - le traitement d'environ 55 % de toutes les infections bactériennes se fait par les antibiotiques formant la famille des  $\beta$ -lactamines
  - Grâce à leur grande efficacité et au peu d'effets secondaires les antibiotiques de cette famille sont les plus utilisées (**Fisher et al., 2005 ; Matagne et al., 1999 ; Schroeder et al., 2002**).

#### **b- Structure**

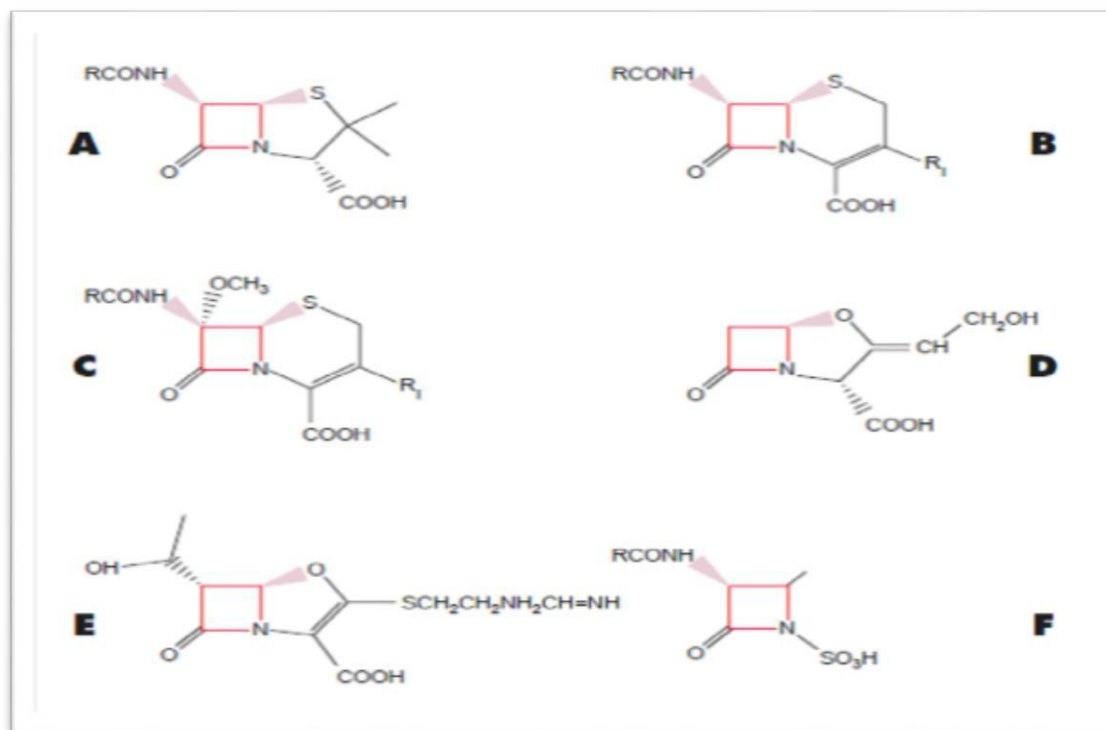
Les  $\beta$ -lactamines ont en commun une structure appelée l'anneau  $\beta$ -lactame, qui est formée de quatre membres : trois atomes de carbone et un atome d'azote. Cet anneau constitue la portion responsable de l'activité de ces molécules. La structure de base des pénicillines, l'acide 6-aminopénicillanique, est constituée d'un cycle thiazolidine lié au cycle  $\beta$ -lactame. Par contre, les céphalosporines se distinguent chimiquement des pénicillines par le remplacement du cycle thiazolidine par un cycle dihydrothiazine (noyau « céphème ») avec un atome de soufre en position 1 (**Dbaiho. 2000**).

Leur noyau céphème est beaucoup plus stable que le noyau péname des pénicillines, ce qui permet aux céphalosporines de mieux résister globalement à l'action diverse des  $\beta$ -lactamases bactériennes.(figure 02)

### c- Classification

C'est une grande famille d'antibiotique dont le représentant le plus ancien est la pénicilline G. Toutes les  $\beta$ -lactamines ont une structure commune, le noyau  $\beta$ -lactame (noyau azétidinone), dont l'intégralité est indispensable à leur activité. La famille des  $\beta$ -lactamines est répartie en quatre principaux groupes :

- ❖ Les pénicillines,
- ❖ Les céphalosporines,
- ❖ Les monobactames
- ❖ Les carbapénèmes (Figure N°02) (**charlier et al.1998** )



**Figure N°02** : Structures de quelques  $\beta$ -lactamines (**Charlier et al. 1998**).

A: pénicillines ; B : céphalosporines; C : céphamycines ; D : acide clavulanique ; E : imipénème (carbapénème); F : monobactames.

#### 1-5-1-1 Pénicillines (noyau pénicillane)

dont font partie la pénicilline G, la méticilline et les isoxazolylpénicillines (oxacilline et cloxacilline), les amino-benzylpénicillines (ampicilline et amoxicilline), les uréidopénicillines (pipéracilline), les carboxy-pénicillines (ticarcilline) et les amidino-pénicillines (mécillinam) (**Paul, 2005**).

### • Mode d'action des pénicillines

Les pénicillines sont produites soit par voie naturelle ou par voie semi-synthétique, elles empêchent les dernières étapes de la formation de la paroi cellulaire, car elles agissent en bloquant la réticulation des peptidoglycanes. Alors, La perte de la paroi cellulaire empêche la croissance de la bactérie et la cellule bactérienne meurt rapidement. Il n'est pas toujours judicieux d'utiliser ce type d'antibiotiques dans le cas des bactéries Gram négatif, puisque les endotoxines peuvent être ainsi libérées (**Gerard. et al., 2003**).

#### I-5-1-1-2 Carbapénèmes (noyau pénème)

qui sont les plus efficaces actuellement, exemples : imipénème, méropénème (**Cavallo et al., 2004**). Ils sont très actifs sur un grand nombre d'espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif. L'imipénème est résistant à la plus part des  $\beta$ -lactamases, y compris les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi. De très rares souches d'entérobactéries sont apparues capables de dégrader l'imipénème ont été décrites.

### • Mode d'action des Carbapénèmes

Les carbapénèmes dont l'imipénème-cilastin, ayant un spectre d'action étonnamment étendu. Ces antibiotiques ont une activité inhibitrice sur la synthèse de la paroi cellulaire. (**Gerard. et al., 2003**).

#### I-5-1-1-3 Céphalosporines (noyau céphème)

Les céphalosporines sont des antibiotiques appartenant à la grande famille des  $\beta$ -lactamines. La mise en évidence de cette famille a été initiée en 1945 par le professeur Brotzu en Sardaigne (**Gootz. 1990**). Il a mis en évidence l'activité antibactérienne du filtrat d'un champignon dénommé *Cephalosporium acremonium*, isolé à partir d'eau de mer prélevée à proximité d'une décharge publique. Ces  $\beta$ -lactamines sont toutes à large spectre et leur intérêt réside surtout dans leur activité sur les bacilles à Gram négatif. Actuellement, il existe quatre générations de céphalosporines classées selon leur date de mise sur le marché et leur spectre d'activité :

✚ **Céphalosporines de 1ère génération** : Elles peuvent être actives sur des souche résistantes aux pénicillines à large spectre. Elles sont par contre détruites par les céphalosporinases de nombreux bacilles à Gram négatif. Les principaux produits sont les suivants : la céfalotine la céfradine...etc (**cavallo et al., 2004**).

- ✚ **Céphalosporines de 2ème génération** : comprend les céphamycines comme la céfoxitine et le céfotétan leur sont rattachées du fait de leur spectre très proche, à certaines entérobactéries productrices de beta-lactamase à spectre étendu (**cavallo et al., 2004**).
- ✚ **Céphalosporines de 3ème génération** : Elles comprennent entre autres le céfotaxime, le latamoxef, la céftriaxone, la céftazidime, le céfménoxime et le céftizoxime. Quelques molécules proches des céphalosporines de 3ème génération, présentent des avantages particuliers relatifs à leurs propriétés antibactériennes ou pharmacologiques : céfopérazone, céfatiam, céfotétan, cefsulodine, céfixime (**cavallo et al., 2004**).
- ✚ **Céphalosporines de 4ème génération** : Ce sont des 7-méthoxyimino céphalosporines zwitterioniques, caractérisées par la présence d'un ammonium quaternaire en position C3. Elles montrent peu d'affinité pour les  $\beta$ -lactamases de classe I et pénètrent très rapidement au travers de la membrane extérieure des bacilles à Gram négatif. Elles comprennent au moins une demi-douzaine de produits incluant cefpirome, céfépime, cefclidine, céfopréane (**Gerard et al., 2003**).

- **Mode d'action des Céphalosporines**

La structure du noyau des céphalosporines ressemble à celle du noyau de la pénicilline, et par le même mécanisme d'action que les pénicillines les céphalosporines inhibent la synthèse de la paroi cellulaire essentiellement. Mais, elles se distinguent des pénicillines par leur résistance aux pénicillinases et par leur efficacité contre un nombre plus grand de bactérie Gram négatif que les pénicillines naturelles. Les céphalosporines sont toutefois sensibles à l'action d'un groupe particulier de  $\beta$ -lactamases (**Gerard et al., 2003**).

#### **I-5-1-1-4 Monobactames**

Un produit est actuellement utilisé, l'aztréonam. Son spectre est limité aux bactéries à Gram négatif aérobies. Ces derniers sont en revanche, très actifs sur les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*. L'activité antibactérienne à Gram négatif de l'Aztréonam, chef de file de cette classe, est globalement comparable à celle de céphalosporine de 3ème génération comme la Céftazidime. L'Aztréonam présente une bonne stabilité vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines de spectre restreint. De plus, les monobactames constituent les seules  $\beta$ -lactamines non hydrolysées par la métallo-  $\beta$ -lactamines (**Courvalin et al., 1991**).

## • Mode d'action de monobactames

Dans le but de vaincre les effets de la pénicillinase, l'aztréonam a été créé et il est le premier agent d'une nouvelle classe d'antibiotiques. Cet antibiotique synthétique, muni d'un seul cycle plutôt que des deux cycles habituels des  $\beta$ -lactames, est alors un monobactame. Le spectre d'action de l'aztréonam est remarquable, pour un composé apparenté aux pénicillines ; cet antibiotique a un effet seulement sur certaines bactéries à Gram négatif, y compris *Pseudomonas* et *E.coli*. Les monobactames ont une caractéristique peu commune, c'est la faible toxicité, constitue un autre avantage de cette molécule (Courvalin *et al.*, 1991).

### I-5-1-1-2.Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines inhibent les transpeptidases et les carboxypeptidases parce qu'elles possèdent une analogie structurale avec le substrat naturel de ces enzymes et se fixent par une liaison covalente sur des cibles spécifiques, les PLP (protéine de liaison à la pénicilline) ce qui inhibe la transpeptidation et la synthèse du peptidoglycane. Une fois fixé sur les PLP, les  $\beta$ -lactamines provoquent une déstructuration du peptidoglycane et la libération de l'acide lipoteichoïque qui mettent en jeu le système autolytique bactérien (figure 3) (Nanninga, 1991).

#### a- Synthèse de peptidoglycane

La formation du peptidoglycane est un phénomène complexe en raison du nombre important d'étape mise en jeu et de leur compartimentation dans des sites cellulaires distincts: cytoplasme, membrane cytoplasmique et périplasme (Matagne *et al.*, 1998). Les étapes cytoplasmiques conduisent à la formation de l'UDP-N-acétylmuramyl-pentapeptide à partir de l'UDP-N-acétylglucosamine. Le motif phospho-N-acétylmuramyl-pentapeptide est ensuite transféré à un décaprényle phosphate, puis il y a introduction d'un résidu de N-acétylglucosamine. Le précurseur membranaire ainsi formé sert de substrat pour les étapes de polymérisation, qui ont lieu à l'extérieur de la membrane cytoplasmique et qui comprennent des réactions de transglycosylation conduisant aux pontages entre sous-unités peptidiques (Courvalin *et al.*, 1991).



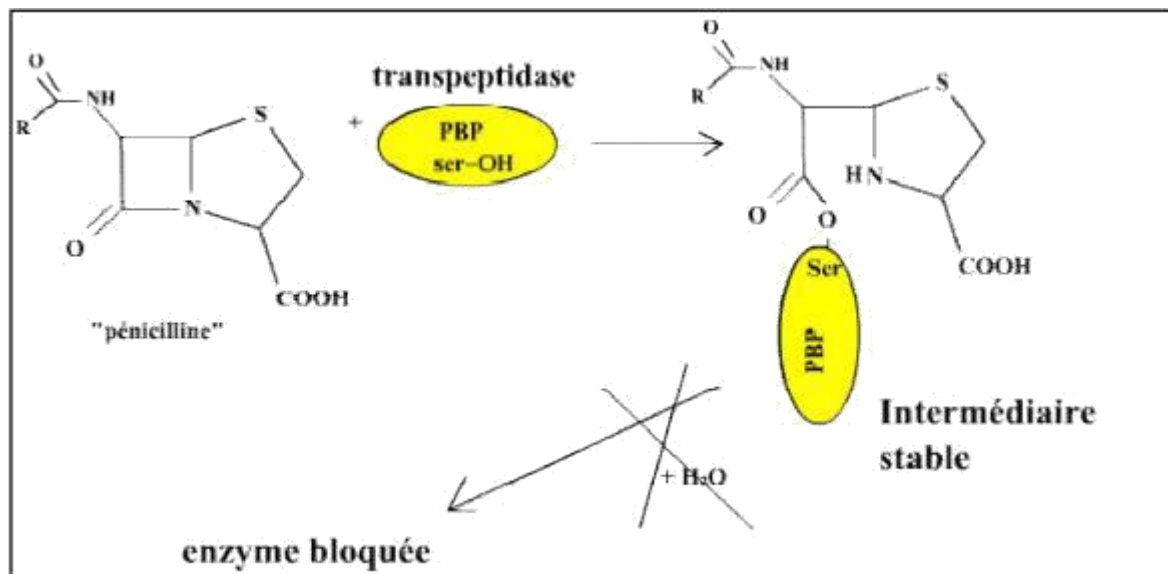


Figure N°03 : Mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines (www.ncbi.nlm.nih.gov)

### I-5-2 Inhibiteurs de la synthèse des protéines

L'antibiotique interfère avec la synthèse protéique bactérienne en agissant sur les ribosomes. En effet, les ribosomes bactériens (constitués de deux sous-unité 30S et 50S formant un ribosome 70S) sont différents des ribosomes eucaryotes (constitués de deux sous-unités 40S et 60S formant un ribosome 80S) offrant la possibilité d'avoir des substances dont l'action est très spécifique. ce sont les Aminosides, Macrolides-Lincosamides- Streptogramines (MLS), Tétracyclines, Phénicolés (Gogny *et al.*, 2001)

#### I-5-2-1 Aminosides

##### I-5-2-1-1 Définition

Les antibiotiques aminosidiques ou aminoglycosides sont des molécules de petite taille, présente un large spectre, bactéricide, constituées de plusieurs cycles substitués par des fonctions amines et hydrolyse notamment et dont certains sont des cycles sucrés. Ces composés sont largement employés en thérapeutique dans le traitement des infections bactériennes sévères, principalement en milieu hospitalier (Courvalin *et al.*, 1991).

##### I-5-2-1-2 Mode d'action des aminosides

Le transport des aminosides à l'intérieur des bactéries est un processus requérant de l'énergie et que l'on peut décomposer en trois étapes successives.

- Première étape : Très rapide non spécifique et réversible, aboutit à la fixation des aminosides, molécules fortement cationique, sur des structures anioniques externe de la

membrane cytoplasmique et ce via les interstices du peptidoglycane chez les Gram positif, par des pores ou par dislocation du lipopolysaccharide chez les Gram négatif (**Changeur et Cherruault., 2009**).

- Deuxième étape: requiert une énergie métabolique délivrée par un gradient entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule et cette étape peut être bloquée par mutation. Elle peut également être perturbée, si les conditions strictes exigées par la production d'énergie oxydatif pour le transport des aminosides ne sont pas respectées .

### **I-5-3 Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires I-**

#### **5-3-1 Polymixines**

Ce sont des antibiotiques de nature polypeptidique, elles ne sont actives que sur les bactéries gram négatif, leurs cibles sont les membranes lipidiques, la membrane externe d'abord puis la membrane cytoplasmique. (**Ferech et Coenen,2006** )

#### **I-5-4 Inhibiteurs des acides nucléiques**

L'antibiotique agit en se liant au complexe ADN-ADN gyrase bactérienne ce qui a pour effet d'inhiber la gyrase, cet enzyme rajoute des super tours négatifs à l'ADN, préalable indispensable à l'ouverture de la double hélice. Cela inhibe la réplication de l'ADN, indispensable à la formation de nouvelles bactéries, ainsi que la transcription. (**Livermore. 1995**)

**I-5-4-1 Rifamycines :** Inhibition de la transcription de l'ADN en ARN messager (ARNm) par inhibition de l'ARN polymérase.

**I-5-4-2 Quinolones :** Les quinolones inhibant la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe « ADN-ADN gyrase » en empêchant la réplication et la transcription de l'ADN bactérien.

#### **I-5-5 Inhibiteurs de la synthèse des folates**

##### **I-5-5-1 Sulfamides**

Ils ont une activité bactériostatique, ils entrent en compétition avec l'acide para-amino benzoïque (PAB) bloquant ainsi l'action de la synthétase (**Livermore, 1995** ) On a plusieurs classe des sulfamides selon leur durée ou leur site d'action :

- Les sulfamides classiques : Sulfapyridine, Sulfamerazine, Sulfafurazol.
- Les sulfamides urinaires : Sulfamoxole, Sulfamethoxazole, Sulfomerazine.

- Les sulfamides intestinaux : Sulfaguanidine, Succinylsulfathiazol.
- Les sulfamides à usage local : Sulfafurazd, Sulfanilamide, Sulfacelamide.

### **1-5-5-2- Triméthoprim**

Agit dans le blocage enzymatique de la synthèse des folates, juste après les sulfamides. L'association « Sulfamide Triméthoprim » : les deux molécules bloquent la synthèse des folates à deux stade différents, ce qui renforce leur activités antibactérienne.

## **I-6 Antibiotiques utilisés en élevage**

### **1-6-1 Antibiotiques facteurs de croissance**

Les promoteurs de croissance sont des antibiotiques qui, administrés à faibles doses dans l'alimentation animale ont un effet préventif sur certaines infections bactériennes et modifient la composition du microbiote intestinal entraînant une meilleure assimilation des aliments par les animaux. Ces effets protecteurs entraînent un effet zootechnique sous forme d'une augmentation de la vitesse de croissance (**Livermore, 1995**). Par souci de protection du consommateur, les instances européennes responsables de l'autorisation de mise sur le marché des additifs destinés à l'alimentation animale ont considéré que le bénéfice zootechnique ne justifiait pas cette utilisation. En effet, il existe un risque de sélection de bactéries résistantes pouvant avoir un effet désastreux sur la santé publique. Cependant aux États-Unis, un grand nombre d'antibiotiques reste autorisé à faible dose comme facteurs de croissance . Dans l'UE, seuls les antibiotiques ionophores (monensin, narasin, salinomycine et lasalocidA sont encore autorisés comme coccidiostatiques et en tant qu'additifs alimentaires (**Emmanuel, 2003**)

### **I-6-2 Antibiotiques vétérinaires**

Les antibiotiques sont la principale classe de médicaments vétérinaires utilisés depuis les années 50 pour le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne chez les animaux producteurs de denrées alimentaires et les animaux de compagnie. Les substances utilisées appartiennent aux mêmes familles que celles utilisées en médecine humaine (**Ferech et Coenen, 2006**). Ces médicaments sont utilisés pour prévenir et traiter des maladies infectieuses pouvant entraîner une morbidité importante et être associées à la mortalité. Les affections les plus souvent traitées sont digestives et respiratoires . Pour plusieurs types d'élevages intégrés où les animaux (volaille, veau et poisson) sont élevés en groupe dans des bâtiments, les conditions d'élevage amènent les vétérinaires à prescrire des traitements de groupe à des fins préventives et curatives. Pour d'autres types de production, les traitements sont individuels et sont le plus souvent prescrits à des fins curatives.

Les trois modes d'intervention utilisés en médecine vétérinaire (**Gogny et al., 2001**) sont les suivants : les traitements préventifs (prophylaxie) administrés à un moment de la vie de l'animal où l'apparition d'infections bactériennes est considérée comme très probable ; les traitements curatifs administrés aux animaux malades ; les traitements de contrôle (métaphylaxie) prescrits à des groupes d'animaux en contact avec les animaux malades (**Emmanuel, 2003**).

## **I-7 Résidus d'antibiotiques**

### **I-7-1 Définition de « résidu »**

Les résidus d'antibiotiques présents dans les denrées alimentaires d'origine animale sont les traces de traitements médicamenteux antibiotiques reçus par l'animal de son vivant.

La définition de résidus est codifiée dans une directive européenne (**Directive 81/851/CEE, 1981**). Dans cette Directive, les résidus sont définis comme étant « tous les principes actifs ou leurs métabolites qui subsistent dans les viandes ou autres denrées alimentaires provenant de l'animal auquel le médicament en question a été administré ».

Le règlement 2377/90/CEE modifie légèrement cette définition en la complétant. Les résidus sont définis comme toute substance pharmacologiquement active, qu'il s'agisse de principes actifs, d'excipients ou de métabolites présents dans les liquides et tissus des animaux après l'administration de médicaments et susceptibles d'être retrouvés dans les denrées alimentaires produites par ces animaux.

### **I-7-2 Relation entre résidus d'antibiotiques et résistances bactériennes aux antibiotiques**

L'utilisation des antibiotiques en thérapeutique humaine ou vétérinaire s'accompagne de l'apparition de résistances à ces mêmes antibiotiques chez les bactéries (**Chauvin et al., 2002**) ce qui constitue un problème très préoccupant du fait des répercussions directes sur les possibilités thérapeutiques. Il est bien établi que l'usage des antibiotiques est le facteur le plus important dans la sélection de bactéries résistantes même si l'apparition de résistances spontanées a aussi été démontrée (**Chataigner, 2004**). En général, il y a une relation étroite entre la quantité d'antibiotiques utilisée et le degré de développement des résistances ,

L'acquisition de cette résistance bactérienne peut être due à plusieurs mécanismes (**Chataigner, 2004**) .

- L'apparition d'une mutation génétique et la sélection naturelle des bactéries résistantes si celles-ci sont placées de façon répétée dans un milieu contenant des antibiotiques.

- Le transfert de plasmides entre des bactéries résistantes et sensibles (**Klein, 1999**). Ce transfert de plasmides peut se faire entre des bactéries d'espèces différentes (**Okolo, 1986**) ce qui autorise alors des échanges entre les bactéries d'origine alimentaire et les bactéries du tube digestif de l'homme (**Van den bogaard, 2001**).

Dans le domaine vétérinaire, un suivi de la résistance aux antibiotiques en filière de production animale est réalisé par un réseau unique, le resapath (**Jouy et al., 2002**). Des plans de surveillance de la résistance aux antibiotiques chez des bactéries indicatrices isolées de la flore intestinale des porcs et des volailles, sont menés (**Sanders et al., 2002**). L'analyse des résultats permet d'apprécier l'impact de l'usage des antibiotiques sur la résistance bactérienne chez l'animal de rente, l'importance et l'évolution de cette résistance.

En ce qui concerne les résidus d'antibiotiques, éventuellement présents dans les denrées alimentaires d'origine animale, ces doses très faibles d'antibiotique et de métabolite d'antibiotique pourraient encore avoir une action sur les bactéries présentes dans le tube digestif du consommateur. Ceci pourrait représenter un risque pour la Santé Publique en favorisant le développement et la dissémination de résistances bactériennes chez l'homme (**Tao, Poumeyrol, 1985**).

Pour de nombreux auteurs, les résidus d'antibiotiques entraînent une sélection des souches bactériennes résistantes dans le tractus gastro-intestinal des consommateurs (**Cerniglia, Kotarski, 2005**) mais jamais une induction de la résistance, sauf rares exceptions comme pour l'érythromycine (**Milhaud, Person, 1981**). La pression de sélection favorise l'augmentation du nombre de micro-organismes résistants, que cette résistance soit naturelle ou acquise, et que ces micro-organismes soient pathogènes ou non.

### **I-7-3 Problèmes causés par la présence des résidus d'antibiotiques**

L'antibiotique destiné à l'animal est un médicament au même titre que celui destiné à l'homme; les deux sont soumis à une AMM, Autorisation de Mise sur Marché, mais le médicament vétérinaire a une exigence supplémentaire ; la fixation d'un temps d'attente. En effet, l'utilisation d'antibiotique pourrait amener à une présence anormale de résidus dans les denrées d'origine animale ( **Boultif, 2009**). Il faut toutefois distinguer la notion d'inhibiteurs qui correspond à un problème technologique et la notion de résidus qui correspond à un

problème de santé publique (**Fabre et coll., 2000**). Les résidus d'antibiotiques dans le lait peuvent causer des problèmes à deux niveaux :

- Hygiénique : toxicité des résidus pour le consommateur
- Technologique : entrave la transformation industrielle du lait

### **I-7-3-1 Problèmes sanitaires**

Les services de santé publique se sont inquiétés de la présence d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers. Aujourd'hui, il est généralement reconnu qu'il ne faut tolérer aucune trace d'antibiotique, aussi légère soit-elle, dans le lait et les aliments destinés à la consommation humaine (**Jepsen, 1962**). Si les problèmes potentiels liés à la présence de résidus d'antibiotique ne doivent pas être exagérés, ils ne doivent pas, non plus, être minorés.

- **Problèmes d'allergie**

En médecine humaine, l'allergie est un effet secondaire reconnu des antibiotiques et en particuliers des bêta-lactames, car ces dernières sont à la fois très immunogènes et souvent utilisées. Cependant, compte tenu de très faibles taux de résidus présents dans l'organisme, comparés aux concentrations d'antibiotiques administrées lors de traitement ou de prophylaxie, il est très improbable qu'ils soient à l'origine d'une sensibilisation primaire de l'individu. D'autant plus, lorsque les antibiotiques sont administrés par voie orale, ils subissent des modifications qui tendent à diminuer leur pouvoir allergène (**Boultif, 2009**). Les résidus de pénicilline en particulier forment des complexes avec certaines protéines (albumines) par liaisons covalentes, ils sont alors masqués par la structure tertiaire de l'albumine et deviennent inaccessibles aux anticorps. Il est donc peu probable que des dérivés significativement immunogènes puissent être formés (**Chataigner et Stevens, 2005**).

Ainsi que, l'absolument que l'absorption de lait contenant de la pénicilline peut provoquer des éruptions eczémateuses rémittentes chez les personnes sensibilisées. Le malade cité réagissait fortement à une dose de 15 unités par jour, soit 500 ml de lait contenant 0.03 unité de pénicilline par millilitre. Les réactions allergiques ont été observées chez des personnes déjà sensibilisées, avec la pénicilline par exemple, chez des sujets déjà sensibilisées des doses de 0.03 UI/ml dans le lait peuvent être suffisantes pour entraîner des réactions allergiques : urticaires, dermatoses, prurit, choc, *etc.* (**Boultif, 2009**).

- **Risques toxiques**

La toxicité directe des antibiotiques est dans l'ensemble extrêmement limitée, le cas de toxicité potentielle fréquemment cité est celui du chloramphénicol qui a été responsable d'anémies aplasiques chez l'homme (liées à son utilisation en médecine humaine) l'utilisation vétérinaire de cette molécule est désormais interdite un peu partout dans le monde (**Boultif, 2009**).

- **Modifications de la flore digestive du consommateur**

Dans le tube digestif vivent des milliards de bactéries saprophytes et commensales, surtout des bactéries anaérobies : bactéroïdes, fusobactérium (**Boultif, 2009**). La consommation de produits contenant des résidus d'antibiotiques (cycline, sulfamides) perturbe cette flore intestinale en modifiant sa composition par inhibition sélective : ils dévastent la flore normale et laissent place à d'autres espèces telles que *Escherichia coli*, levures...etc (**Boultif, 2009; Abidi, 2004**). Cette inhibition sélective diminue l'immunité naturelle préétablie, ce qui peut entraîner une atteinte du système nerveux, des os, des dents (coloration des dents en jaune), du foie, du sang (**Broutin, 2005**), ainsi que l'apparition de bactéries mutantes résistantes aux antibiotiques, engendrant des échecs thérapeutiques (**Boultif, 2009**)

- **Risques d'antibiorésistance**

Au cours des deux dernières décennies, les agents pathogènes résistants aux antibiotiques sont devenus un sérieux problème de santé publique. Une des raisons de l'augmentation de cette résistance pourrait résider dans l'utilisation préventive et thérapeutique d'antibiotiques en production animale car les médicaments vétérinaires contiennent en partie les mêmes matières actives qu'en médecine humaine (**Boultif, 2009**). Les bactéries résistantes sont potentiellement transmissibles à l'homme via les denrées alimentaires (**Chataigner et Stevens, 2005**). L'apparition de cette résistance peut être liée à des mauvaises pratiques thérapeutiques (posologie inadaptée, fréquence d'administration, non respect de la prescription...) ( **Chataigner et Stevens, 2005**) ou à l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance, favorisant ainsi le développement rapide du phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques (**Boultif, 2009**).

Il est important de préciser que la problématique de l'antibiorésistance doit être différenciée de celle des résidus d'antibiotiques. Ceux-ci peuvent avoir des répercussions sur la santé des consommateurs (allergies,...etc.) mais ne sont pas en cause dans le développement

de l'antibiorésistance. Par ailleurs, il faut souligner que ce ne sont pas les animaux où les humains qui deviennent résistants aux antibiotiques mais bien les bactéries qui les affectent (**Boultif, 2009**). La Figure N°06 illustre clairement le réseau de transfert de la résistance aux antibiotiques

### **I-7-3-2 Problèmes technologiques**

Les résidus représentent un réel problème pour les transformateurs laitiers par leurs conséquences néfastes sur les fermentations lactiques et constituent le problème majeur des accidents de fabrication. Les bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis*... etc. jouent un rôle essentiel comme ferment en acidifiant le lait (car ils transforment le lactose du lait en acide lactique et la présence de cet acide entraîne une baisse du pH ce qui permet la précipitation des protéines, le développement des arômes et l'inhibition de flores indésirables ( **Abidi, 2004**).

Les bactéries lactiques sont sensibles à de très faibles doses d'antibiotiques ainsi la présence de résidus d'antibiotiques inhibent de manière partielle ou totale la croissance de ces ferments et se traduit par de nombreux défauts notamment les accidents de fabrication du fromage, du yaourt et autres produits de fermentation du lait . Les accidents les plus connus sont les défauts de coagulation du lait, l'insuffisance de l'égouttage et les risques de prolifération incontrôlée de germes gazogènes, insensibles aux antibiotiques (**Abidi, 2004**), telles que les Coliformes, *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Aerobacter*. Ainsi, que la présence de 0,04 à 0,15 UI de pénicilline/ml de lait donnait des fromages d'une qualité inférieure à celle des témoins avec une acidité anormale, une humidité élevée, une texture spongieuse et parfois un goût amer ou doux (**Boultif, 2009**). Des difficultés analogues surgissent lorsqu'on utilise des levains dans la fabrication du beurre et la production de babeurre et de dérivés du lait acidifié. Le Tableau N°01 indique les taux approximatifs auxquels quelques antibiotiques inhibent certains levains dans le lait (**Jepsen, 1962**). De ce fait un lait contenant des antibiotiques ou des résidus d'antibiotiques n'est pas apte à la transformation . Les résidus sont responsables de grandes pertes financières qui se répercutent tout le long de la filière laitière (**Abidi, 2004 ; Boultif, 2009**).



**Tableau N°01 : Taux d'inhibitions de levains lactiques par quelques antibiotiques (boulif, 2009)**

| <b>Antibiotique</b>           | <b>Début d'inhibition<br/>(quantité/ml)</b> | <b>Inhibition totale<br/>(quantité/ml)</b> |
|-------------------------------|---|--|
| <b>Pénicilline (unités)</b>   | 0.05  | 0.1  |
| <b>Chlortétracycline (ug)</b> | 0.02  | 1.0  |
| <b>Oxytétracycline (ug)</b>   | 0.01  | 2.0  |
| <b>Chloramphénicol (ug)</b>   | 0.20  | 10   |
| <b>Streptomycine (ug)</b>     | 0.04  | 10   |

# *Chapitre II*

## Chapitre II : Résistance aux antibiotiques

### II-1 Introduction

De nombreuses molécules des antibiotiques d'origine naturelle ou synthétique, ont été découvertes de la fin des années 1940 jusqu'aux années 1970. Le succès fulgurant des premiers traitements anti-infectieux a fait considérer un peu hâtivement le problème des maladies infectieuses comme définitivement réglé. Mais, rapidement, l'enthousiasme a décliné avec l'apparition des premières résistances des bactéries aux antibiotiques. Les bactéries ont su s'adapter et résister plus ou moins vite à chaque nouvel antibiotique introduit en thérapeutique. Ces résistances peuvent avoir un spectre étroit, limité à un ou quelques antibiotiques de structure voisine, mais on observe depuis plusieurs années l'émergence de mécanismes de résistances croisées à des drogues de structures et de modes d'actions différents. Aujourd'hui, apparaissent de véritables « monstres » bactériens résistants à tous les antibiotiques potentiellement actifs (**Ploy *et al.*, 2000**).

### II-2 Définition

Une bactérie est résistante à un antibiotique quand la CMI de celui-ci est supérieure à la concentration sanguine maximale médicamenteuse susceptible d'être atteinte avec une posologie standard.

La CMI ou concentration minimale inhibitrice, est la concentration la plus petite d'un antibiotique qui empêche les bactéries de se multiplier. C'est le paramètre le plus utile pour mesurer *in vitro* l'activité d'un antibiotique ; elle s'exprime en mg/l, il existe deux types de résistances : la résistance naturelle et la résistance acquise. (**poy *et al.*, 2000**)

### II-3 Origines de la résistance aux antibiotiques

La mutation est un événement aléatoire qui se passe au cours de la réplication de l'ADN dans les bactéries. La mutation est également une origine de l'antibiorésistance. L'antibiorésistance due à une mutation n'est généralement pas en mesure d'être transférée à d'autres souches. La fréquence absolue de la mutation est très faible (environ  $10^{-7}$ ), mais en raison de la grande taille du génome et des populations élevées de certaines bactéries en culture, sous certaines conditions, muté bactérie résistante aux antibiotiques peut se produire (**Allen *et al.*, 2010**).

Sous la constante pression d'antibiotique, la bactérie résistante a l'avantage d'adaptation pour survivre et proliférer. Par conséquent, même si les mutations sont rares, l'utilisation des

antibiotiques a long terme conduirait à des isolats résistants qui pourraient prospérer dans la présence continue d'antibiotiques.

Les antibiotiques sont des produits naturels de bactéries et de champignons. Logiquement, ces producteurs d'antibiotiques devraient porter des mécanismes de « l'immunité » pour empêcher les antibiotiques qu'ils produisent de détruire eux-mêmes . . Les bactéries qui peuvent produire des antibiotiques ont effectivement des mécanismes qui sont semblables aux mécanismes de l'antibiorésistance, pour se protéger. Ces mécanismes comprennent temporaire intracellulaire inactivation de l'antibiotique, l'efflux des antibiotiques produites et la modification de la cible de l'antibiotique dans le producteur . À titre d'exemple, certaines enzymes inactivant les aminoglycosides trouvées dans *Streptomyces* produisant des aminoglycosides et sont similaires aux gènes de la résistance aux aminoglycosides de bactéries à Gram négatif résistants aux aminoglycosides (**Benveniste et Davies, 1973** ). Ces données suggèrent que certains antibiorésistance potentiellement provenait de producteurs d'antibiotiques.

Certains gènes de la résistance aux antibiotiques existaient même avant l'utilisation de cet antibiotique et les bactéries résistantes aux antibiotiques Ont été documentés dans des endroits sans l'application d'antibiotiques (**Allen et al., 2010**). Par exemple, sérine  $\beta$ -lactamases est censé provenir de plus de 2 milliards d'années, et beaucoup ont été plasmide codée pour des millions d'années (**Allen et al., 2010**). C'est logique, puisque certains mécanismes de l'antibiorésistance ne servent pas seulement à combattre les antibiotiques mais servent aussi d'autres fonctions métaboliques essentielles chez les bactéries (**Allen et al., 2010**). Nombreuses pompes d'efflux non seulement pompe antibiotiques hors de la cellule bactérienne, mais sont également essentiels pour éliminer les déchets toxiques alvéolaires (**Allen et al., 2010**) Par conséquent, il est difficile de voir le lien de causalité entre l'utilisation d'antibiotiques et les origines des gènes de l'antibiorésistance . Toutefois, il est certain que la pression sélective de l'utilisation des antibiotiques et la mauvaise utilisation, est une préoccupation majeure concernant la diffusion des gènes de l'antibiorésistance , aboutissant à des générations de bactéries résistantes aux antibiotiques

## **II-4 Mécanismes de la résistances**

### **II-4-1 Résistance naturelle**

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les cellules de toutes les souches alors que la résistance acquise est un caractère qui ne concerne

que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. La résistance naturelle est stable, transmise à la descendance mais pas ou peu transmissible sur un mode horizontal. Inversement, la résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. La résistance naturelle a pour support génétique le chromosome bactérien et elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques (**Fauchère et Avril, 2002**). Ses mécanismes biochimiques sont nombreux et quelques uns d'entre eux sont cités ci-dessous.

- ✚ Les bacilles à Gram négatif (et notamment les entérobactéries dont *K.p* et *Pseudomonas aeruginosa*) sont naturellement résistants, le plus souvent à bas niveau, aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée (pénicilline G, pénicilline M, macrolides, rifampicine, acide fusidique, novobiocine, vancomycine) puisque ces antibiotiques ne peuvent traverser la membrane externe de la paroi. *Klebsiella pneumoniae* est naturellement résistante à l'amoxicilline, ampicilline et à la ticarcilline, grâce à une  $\beta$ -lactamase chromosomique naturelle
- ✚ Les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies. Pour les mêmes raisons, les bactéries aéroanaérobies facultatives sont moins sensibles aux aminosides lorsqu'elles sont placées dans un environnement pauvre en oxygène (**Paul, S .2005**).
- ✚ Certaines espèces (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *Bacillus cereus*, *Nocardia* spp., ...) produisent naturellement des  $\beta$ -lactamases (**Paul, S.2005**).

#### **II-4-2 Résistance acquise**

Elle existe grâce à l'acquisition d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance qui déterminent un phénotype bien précis de résistance, différent du phénotype sauvage, caractérisant les souches n'ayant pas acquis ce mécanisme. Elle ne concerne qu'une population plus ou moins importante de souches d'une espèce. Dès le début de l'antibiothérapie la résistance acquise a été observée mais sa fréquence était faible. Ultérieurement, la généralisation de l'utilisation des antibiotiques a conduit à une sélection des souches résistantes et on constate, quotidiennement, que de très nombreuses souches ne se comportent pas à l'égard des antibiotiques conformément à ce que les spectres d'activité permettraient de

le supposer. Ce phénomène a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis à-vis des antibiotiques **(Mekentichi, 2003)**

#### **II-4-2-1 Mutation chromosomique (évolution verticale)**

La mutation chromosomique spontanée constitue un mécanisme de résistance aux antibiotiques chez environ 10 à 20% des bactéries. Elle produit environ une fois pour chaque milliard de divisions cellulaires **(Pallasch, 2003)**.

#### **II-4-2-2 Acquisition de gène de résistance (évolution horizontal)**

La résistance bactérienne par acquisition d'information génétique exogène représente la majorité des cas isolés en clinique s'observe aussi bien chez les bactéries Gram positif qu'à Gram négatif. L'acquisition de nouveau matériel génétique peut se faire soit par échange direct de matériel chromosomique, soit par échange d'élément mobile. Dans ce dernier cas, les gènes de résistance se trouvent dans un fragment d'ADN bactérien situé à l'extérieur et sur certains éléments mobiles du chromosome, tels les transposons. Cette forme de résistance est transférable d'une bactérie à l'autre et même à des bactéries d'espèces différentes. Le risque d'une résistance à plusieurs antibiotiques augmente aussi avec le transfert d'un seul plasmide. Par exemple, *Enterococcus faecalis* peut transférer un plasmide responsable de résistance à quatre ou cinq antibiotiques différents.

Les gènes ou les groupes de gènes de résistance peuvent s'acquérir par transformation, transduction ou conjugaison **(Carattoli, 2001)**

- **Transformation**

La transformation est un processus actif qui permet le transfert et l'échange de gène, ce phénomène naturel est contrôlé par des gènes chromosomiques qui permettent l'absorption de l'ADN exogène libre par une cellule compétente. C'est un mécanisme d'échange de gène très répandu, mais pas universel entre les souches bactériennes **(Levy *et al.*, 1998)**.

Beaucoup de bactéries transformables libèrent leur ADN pendant la croissance. Ainsi, au moins 50 bactéries différentes ont été démontrées comme étant compétentes pour acquérir des gènes libérés dans l'environnement par d'autre organisme, même d'origine eucaryote (plante, levures et animaux) **(Havarstein *et al.*, 1998)**. Les gènes acquis après transformation doivent être intégrés dans un plasmide ou un chromosome pour être fonctionnel **(Levy *et al.*, 1998)**

après une recombinaison homologue entre les séquences exogène et endogène (**Michael, John .M .2007**).

- **Transduction**

Dans le phénomène de la transduction, l'ADN est transféré d'une cellule à une autre par un bactériophage. Ce mécanisme se produit généralement lorsqu'un virus porte accidentellement de l'ADN d'une cellule bactérienne et l'injecte dans une autre essentiellement à la même espèce (**Davison , 1999**). Le transfert de gènes de l'hôte par les phages peut se faire de deux façons. Dans le premier cas, appelé transduction généralisée, et dans le deuxième cas transduction spécialisée (**Michael , John .M .2007**).

- **Transduction généralisée**

Elle résulte d'une erreur rare lors de l'assemblage d'un phage, lorsqu'un segment de génome de l'hôte est emporté avec l'ADN du phage. Cet ADN sera injecté à l'intérieur de la bactérie réceptrice et pourra apporter des gènes de résistances aux antibiotiques transmis verticalement à la descendance. S'il n'est pas intégré au chromosome de la réceptrice il sera perdu par dilution au cours des divisions bactériennes (**Michael, John .M .2007**).

- **Transduction spécialisée**

C'est une caractéristique de certains phages lysogènes qui sont restés intègres dans le chromosome de l'hôte un certain temps. A l'activation, l'excision du génome viral emporte des gènes adjacents de leur site d'intégration, l'infection d'une autre bactérie par ces virions apportera à celle-ci des nouveaux gènes qui pourront être des gènes de résistances aux antibiotiques (**Michael et John. 2007**).

- **Conjugaison**

La conjugaison est un processus au cours duquel l'ADN est transféré d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice. La conjugaison est un mécanisme qui implique un plasmide, et Le plasmide conjugatif utilise ce mécanisme pour transférer une copie de lui-même à un nouvel hôte. Donc, La conjugaison est un procédé de transfert génétique qui nécessite un contact direct entre deux cellules (**Michael et John .2007**), et responsable en grande partie de l'émergence d'une résistance chez les bactéries pathogènes. En pareil cas, la résistance se transmet aux bactéries filles. Les bactéries ayant reçu cet élément mobile peuvent se rétablir et redevenir sensibles aux antibiotiques si elles ne sont pas exposées à ces derniers (**Yamashita et al., 2000**).

Les trois mécanismes de transfert génétique sont illustrés dans la figure 04

### II-4-3 Résistance croisée et Co-résistance

La résistance croisée résulte d'un seul mécanisme biochimique et concerne des antibiotiques appartenant à la même famille. La Co-résistance est liée à plusieurs mécanismes (plusieurs gènes de résistance impliqués) et concerne des antibiotiques appartenant à différentes familles.

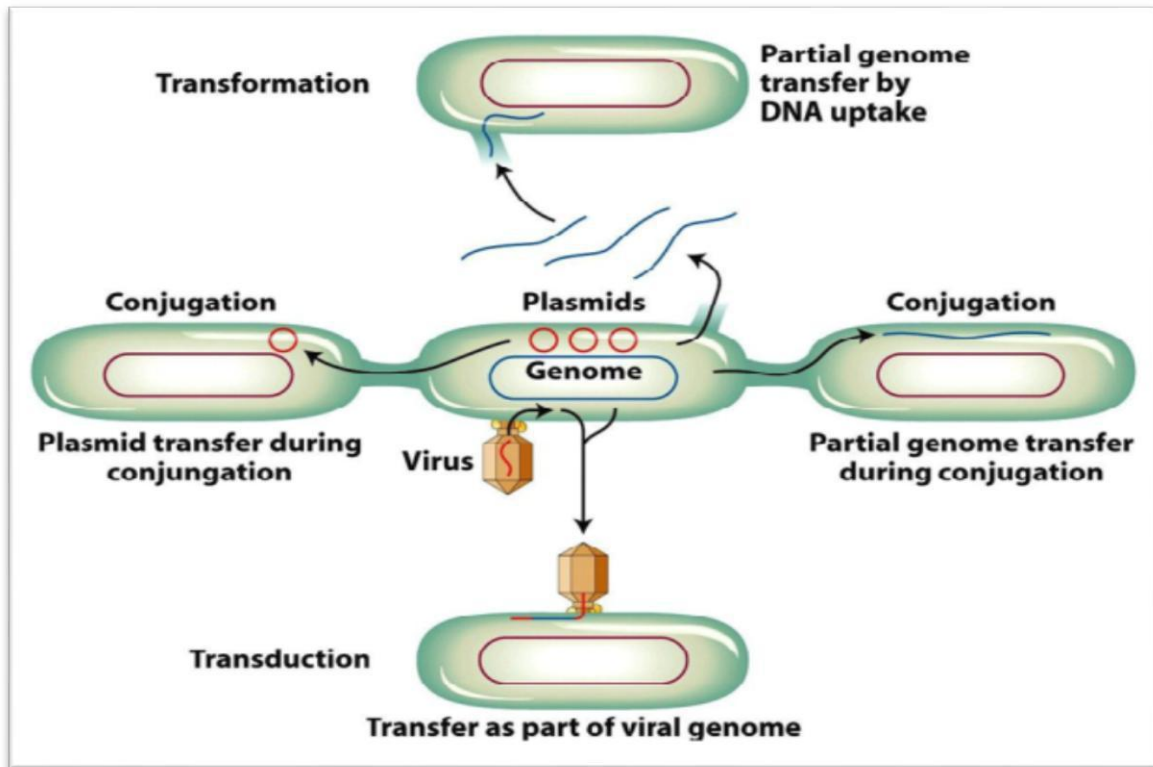


Figure N°04 : Les trois mécanismes de transfert génétique (Carattoli, 2001)

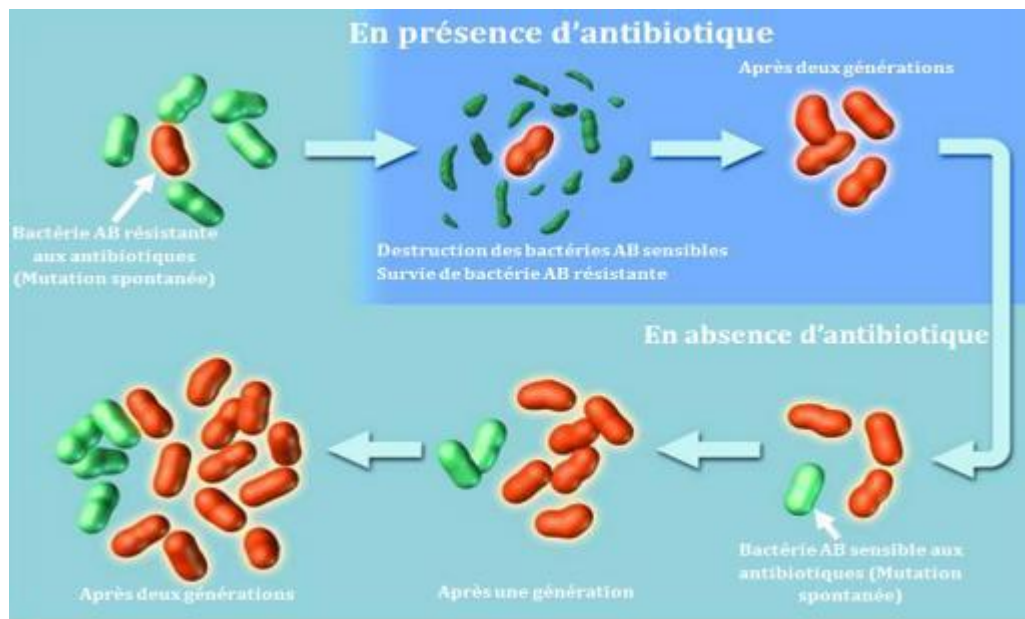
### II-5 Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration élevée de cet antibiotique (paul,2005). Alors ces micro-organismes ont développé trois types de mécanismes de résistance (tableau 02)

- Le premier est la production d'enzymes inactivatrices des antibiotiques (ex :  $\beta$ -lactamases).
- Le deuxième est la modification des cibles des antibiotiques empêchant l'action de ces derniers, comme par exemple la résistance aux fluoroquinolones par modification des topoisomérases de classe II.



- Enfin, le troisième mécanisme est la réduction des concentrations intracellulaires d'antibiotique. Ce phénomène peut être dû à un transport actif vers l'extérieur de la cellule via des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux et/ou à une imperméabilité (Cattoir, 2004) (ex. résistance à l'imipénème causée par la surproduction de AmpC pouvant être associée à des pertes de porines de la membrane externe et/ou la surexpression des pompes à efflux) (Paul, 2005).



**Figure N°05:** Schéma illustrant le développement de la résistance aux antibiotiques (Cattoir,2004)

Commençant à l'angle supérieur gauche, une mutation spontanée dans une population de bactéries sensible aux antibiotiques conduit à une résistance dans une seule bactérie. La présence d'antibiotiques provoque une sélection des bactéries résistantes. Cependant en absence d'antibiotique (en bas à droite),

les bactéries résistantes peuvent perdre leur résistance par une mutation spontanée. Après plusieurs générations, les proportions de bactéries sensibles et résistantes atteignent un nouvel équilibre.

**Tableau N° 02 : Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques (Li et Nikaido, 2004).**

| Antibiotique   | Cible Bactérienne        | Mécanisme de résistance  |                       |                           |              |
|--|--------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|--------------|
|  |                          | Inactivation Enzymatique | Modification de cible | Imperméabilité Cellulaire | Efflux Actif |
| <b>Inhibition de la synthèse de la paroi (peptidoglycane)</b>  |                          |                          |                       |                           |              |
| $\beta$ -lactamines  | PLP                      | +++                      | ++                    | ++                        | ++           |
| <b>Glycopeptides</b>   | Précurseurs D-Ala-D-Ala  |                          | +++                   |                           |              |
| <b>Inhibition de la synthèse protéique</b>                     |                          |                          |                       |                           |              |
| <b>Aminosides</b>  | ARN ribosomal 30S        | +++                      | ++                    | +                         | +            |
| <b>MLS</b>   | ARN ribosomal 50S        | +                        | +++                   |                           | ++           |
| <b>Tétracyclines</b>   | ARN ribosomal 30S        |                          | ++                    |                           | +++          |
| <b>Phénicolés</b>  | ARN ribosomal 50S        | ++                       |                       |                           | ++           |
| <b>Oxazolidinones</b>  | <b>ARN ribosomal 50S</b> |                          | ++                    |                           |              |
| <b>Inhibition de la synthèse ou de fonctionnement de l'ADN</b> |                          |                          |                       |                           |              |
| <b>Fluroquinolones</b>   | Topoisomérase            |                          | +++                   |                           | ++           |
| <b>Rifamycines</b>   | ARN Polymérase           |                          | +++                   |                           | +            |
| <b>Sulfamides</b>  | DHFS                     |                          | ++                    |                           | +            |
| <b>Triméthoprimes</b>  | DHFR                     |                          | ++                    |                           | +            |

## II-6 Diffusion des bactéries résistantes entre l'animal et l'Homme

Les agents antimicrobiens couramment utilisés chez les animaux appartiennent essentiellement aux mêmes classes de composés que ceux utilisés en médecine humaine. Chez les animaux, les antibiotiques sont utilisés pour trois différentes raisons: pour le traitement des

infections bactériennes (usage thérapeutique), pour prévenir les infections chez les animaux (Utilisation prophylactique) et utilisé comme promoteur de croissance dans l'alimentation animale à titre d'additif en vue d'améliorer la croissance et les performances des animaux (facteur de croissance) ( **Singer et al., 2003 ; Dibner et al., 2005**). L'utilisation inappropriée d'antibiotique chez les animaux et surtout comme facteur de croissance a facilité la propagation des résistances acquises. Ce phénomène d'antibiorésistance est constaté comme l'un des problèmes mondial de santé publique ( **Normak et al., 2002** ). De plus, les bactéries isolées chez les animaux et celles isolées chez l'Homme, que ce soit lors d'une infection ou en situation de colonisation, partagent les mêmes mécanismes de résistance. Cela est un argument extrêmement solide de l'absence d'étanchéité entre le monde animal et les populations humaines.

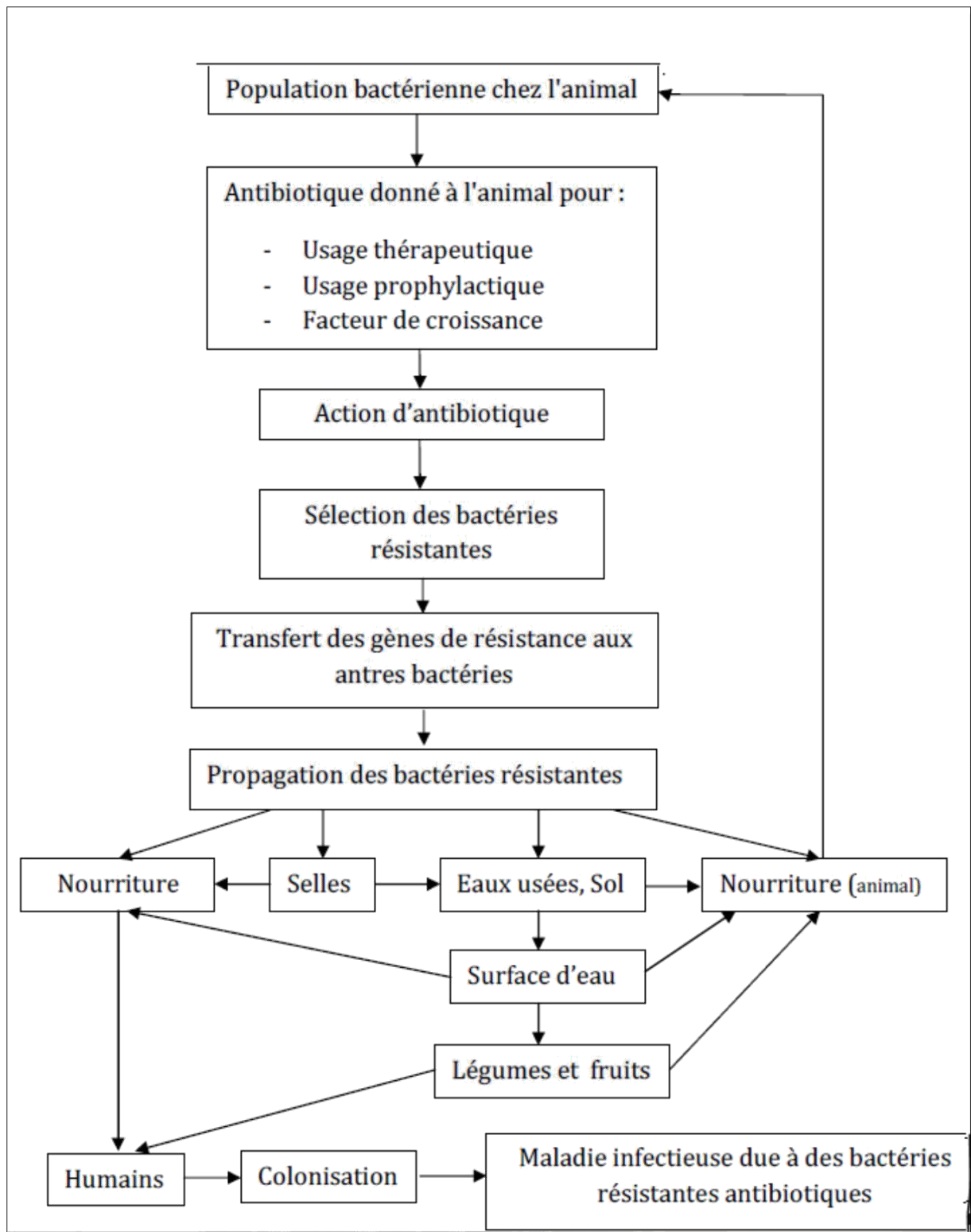
Les animaux de rente et les animaux de compagnie, tout comme les humains, peuvent être des réservoirs de bactéries résistantes, et le développement de ces germes résistants peut se produire aussi bien chez l'Homme que chez l'animal ( **Bates et al., 1994**).

La dissémination de ces bactéries résistantes entre les différents hôtes (animal-animal, humain-humain, animal-humain ou humain-animal) peut se produire par contact direct ou par contact avec des matières contenant des bactéries (salive, fèces, ...) mais peut également se produire par la contamination de la nourriture (la chaîne alimentaire), de l'air ou de l'eau (l'environnement) ( **Figure 6**). Lorsqu'elle atteint un nouvel hôte, la bactérie peut coloniser ou infecter. Elle peut alors disséminer ses gènes de résistance aux autres bactéries présentes dans cet écosystème (bactéries commensales ou pathogènes dans le cas d'infection du tractus gastro-intestinal) mais également recevoir elle-même des gènes de résistance présentés chez d'autres bactéries.

La diffusion de bactéries résistantes aux antibiotiques de l'animal à l'homme est donc non seulement possible, mais de nombreux arguments attestent de sa réalité pour certains pathogènes. Dès 1969 un rapport de Swann au Royaume Uni a attiré l'attention sur le potentiel de dissémination des bactéries résistantes issues d'animaux traités par des antibiotiques *via* la chaîne alimentaire . Depuis, différentes études ont mis en évidence des transferts des bactéries résistantes (*E. coli*, *Salmonella* et *Campylobacter*) de l'animal à l'Homme via la chaîne alimentaire ou par un contact direct, conduisant à l'établissement d'un réservoir de gènes de résistances ( **Levy et al., 1976 ; Van Den et al., 1999**)

Cependant, les bactéries zoonotiques résistantes sont les seules dont on peut dire avec certitude qu'elles passent de l'animal à l'Homme (Salmonelles, *Campylobacter*, entérocoques et *E. coli*) ( **Witte ,1998**), principalement *via* la chaîne alimentaire car il n'y a pas de contamination "inter-humain" pour ces pathogènes.

Une autre voie possible de la propagation de la résistance *via* la chaîne alimentaire est l'utilisation des bactéries lactiques dans l'industrie agro-alimentaire comme probiotiques. Ces bactéries sont considérées comme des réservoirs de gène de résistance transmissibles horizontalement aux bactéries pathogènes.



**Figure N°06 :** Voies possibles de la transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques origines animales aux humains. (Claycamp et Hooberman ,2004).

## II-7 Evaluation de l'antibiorésistance

Les tests de sensibilité bactérienne les plus répandus ont pour but d'étudier l'effet bactériostatique ou bactéricide des antibiotiques (**Chengappa et al., 1990**). Pour chaque souche bactérienne, on peut définir une concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe. Elle est donc associée à un phénomène macroscopique, ce qui explique sa relative facilité d'obtention et son universalité.

Il existe deux grandes familles de tests pour étudier l'effet bactériostatique ou bactéricides:

- Ceux utilisant une méthode quantitative aboutissant à un résultat chiffré correspondant à une CMI : ce sont les tests par dilution,
- Ceux utilisant une méthode qualitative permettant de classer les bactéries en sensible(S), ou résistante(R) : ce sont les tests par diffusion.

Toutes ces méthodes doivent suivre des règles de standardisation rigoureuses pour pouvoir être reproductibles, interprétables et comparables au sein du laboratoire, du pays ou entre les Etats.

Toutefois il existe autres méthodes pour l'étude de l'antibiorésistance utilisant des méthodes **génotypiques** permettant de détecter les déterminants génétiques de la résistance. La PCR (Polymerase Chain Reaction) est classiquement utilisée. Cependant le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de développer des puces à ADN qui peuvent détecter un large panel de gènes de résistance (**Ojha et al., 2008**).

### II-7-1 Méthode par dilution

Le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM), (Comité de l'antibiogramme 2005) définit la CMI comme étant la plus faible concentration d'une gamme de dilution d'antibiotique de demi en demi qui inhibe la croissance visible du germe.

L'avantage des méthodes par dilution est leur relative souplesse d'utilisation puisqu'on peut supplémenter le milieu de culture pour des germes à besoin particulier et utiliser n'importe quel antibiotique pourvu qu'il soit disponible sous forme de poudre ou liquide. De plus, les résultats peuvent être donnés sous forme de CMI et/ou sous forme de classification "Sensible(S)/Intermédiaire (I)/Résistant (R)".

Ces techniques de dilution, sur milieu solide ou en milieu liquide, sont les méthodes de référence. (Chengappa *et al.*, 1990)

- **Méthode par dilutions successives en milieu solide**

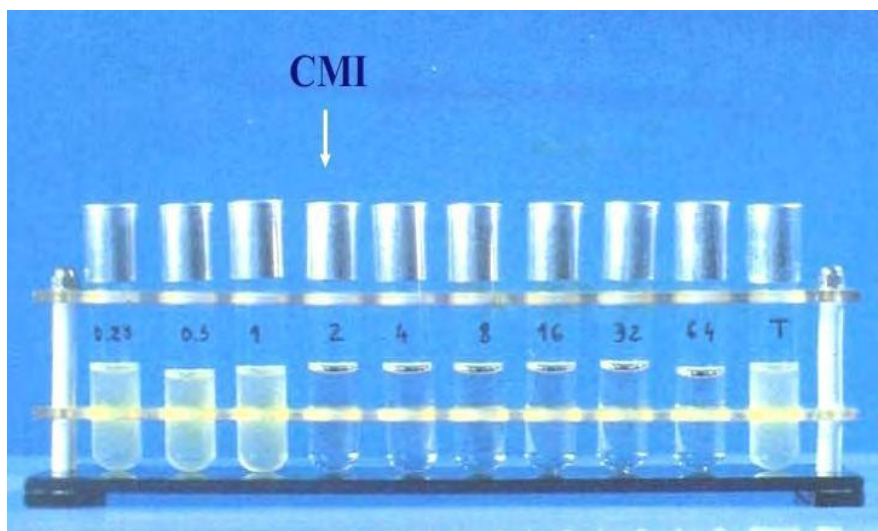
Cette méthode consiste en l'ensemencement de géloses contenant des concentrations décroissantes en antibiotique. On recherche la plus faible concentration pour laquelle il y a inhibition macroscopique de la croissance bactérienne.

La lecture des CMI est effectuée à l'oeil nu. La concentration inhibitrice à considérer est la concentration minimale d'antibiotique pour laquelle aucune croissance n'est détectée.

C'est une méthode de référence du fait de sa standardisation et qui permet d'évaluer les performances des autres tests. (Ojha *et al.*, 2008).

- **Méthodes par dilutions successives en milieu liquide**

Le principe est le même que pour le milieu solide sauf que l'on travaille en milieu liquide (Figure 07). On peut faire une distinction entre des méthodes de macrodilution et des méthodes de microdilution.

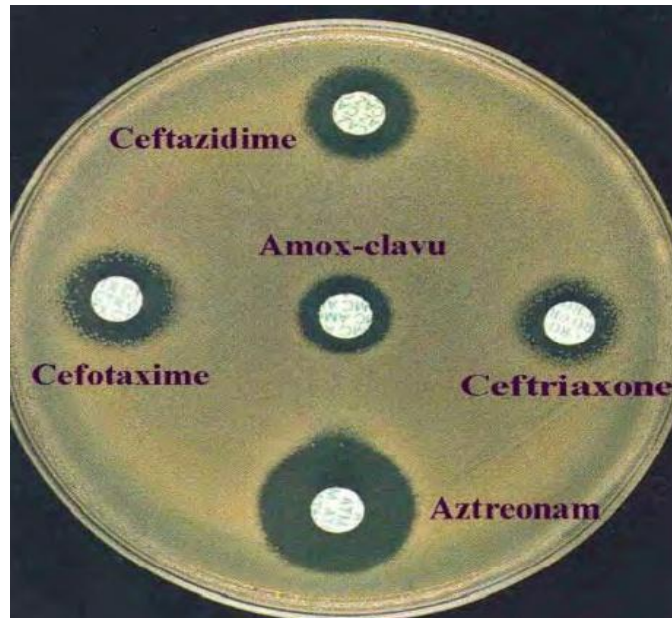


**Figure N°07:** Exemple de la détermination de la CMI par la méthode des dilutions sériées. (Ojha *et al.*, 2008).

## II-7-2 Méthode par diffusion en milieu solide

Ce test consiste en l'application de disques imprégnés d'antibiotiques sur une gélose préalablement ensemencée par des bactéries. L'antibiotique va diffuser dans la gélose avec une concentration décroissante vers la périphérie. Dans la zone où la concentration est

inhibitrice, on n'observera pas de croissance bactérienne. Avec la mesure du diamètre de la zone d'inhibition et grâce à des abaques, on pourra classer la bactérie en sensible (S) ou résistante (R). L'analyse de l'efficacité de différents antibiotiques sur une souche bactérienne donne un antibiogramme (**Figure 08**).

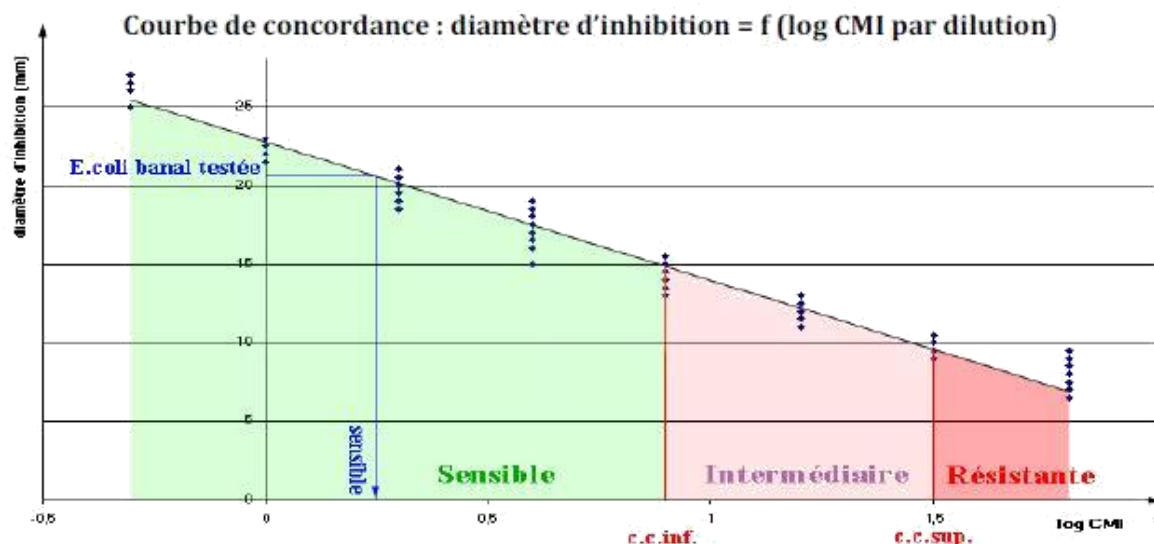


**Figure N°08** : Exemple de gélose avec des disques d'antibiotiques et une souche bactérienne ayant une sensibilité variable aux antibiotiques testés. (**Ojha et al., 2008**)

### **II-7-3 Etablissement de la courbe de concordance**

Pour un grand nombre de souches, on met en relation le diamètre d'inhibition avec la CMI obtenue par une des méthodes de dilution: on obtient un nuage de points dans un graphique représentant le diamètre en fonction du  $\log_2$  de la CMI (Figure 09). On peut calculer alors une courbe de régression, appelée courbe de concordance, qui met en relation la CMI avec le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne (**Tunneval et Ericson, 1954**)





**Figure N°09** : Exemple de courbe de concordance avec détermination des diamètres discriminants à partir des CMI discriminantes. (Tunneval et Ericson, 1954).

## II-8 La lutte mondiale contre l'antibiorésistance

L'antibiorésistance est un problème sanitaire de plus en plus préoccupant dans l'Union Européenne: chaque année, environ 25 000 patients meurent des suites d'infections provoquées par des bactéries résistant aux antibiotiques, un phénomène qui entraîne un surcroît de dépenses de santé et des pertes de productivité de plus de 1,5 milliard d'euros.

Sur le plan international, de nombreuses réflexions autour de la lutte contre l'antibiorésistance se sont développées dès les années 1990, sous l'égide des organisations internationales, la FAO, l'OMS et l'OIE. Ainsi des lignes directrices sur la surveillance de la résistance et des consommations d'antibiotiques en médecine vétérinaire ont été adoptées. Récemment, en juillet 2011, la Commission du *Codex alimentarius* (organisation créée par la FAO et l'OMS) a adopté les "Lignes directrices pour l'analyse des risques d'origine alimentaire liés à la résistance aux antibiotiques".

Dans le domaine vétérinaire, plusieurs actions ont déjà été initiées par les pouvoirs publics pour surveiller l'évolution de l'antibiorésistance (mise en place de réseaux, de programmes de surveillance et d'enquête en élevage coordonnés par le ministère chargé de l'agriculture et l'ANSES<sup>1</sup>) et par les professionnels impliqués pour promouvoir le bon usage des antibiotiques (filères de l'élevage, vétérinaires, industrie pharmaceutique). De plus, l'utilisation en élevage des antibiotiques comme facteurs de croissance est interdite dans l'Union Européenne depuis 2006.

Quelques approches pour la lutte contre l'antibiorésistance :

- Garantie d'une utilisation appropriée des antimicrobiens tant chez l'homme que chez les animaux,
- Prévention des infections microbiennes et de leur propagation, Mise au point de nouveaux antimicrobiens efficaces ou recherche d'autres solutions de traitement,
- Endiguement des risques de propagation de la résistance aux antimicrobiens en coopération avec les partenaires internationaux,
- Amélioration du suivi et de la surveillance en médecine humaine et en médecine vétérinaire,
- Intensifier et coordonner les travaux de recherche, communication, éducation et formation,
- Mieux informer le grand public quant à la résistance aux antimicrobiens,
- Renforcer les systèmes de surveillance de la résistance aux antimicrobiens et de l'utilisation d'antimicrobiens en médecine vétérinaire et l'interdiction d'utilisation d'antibiotiques comme promoteurs de croissance,
- Renforcer les systèmes de surveillance de la résistance aux antimicrobiens des bactéries destinées à être utilisées comme additifs alimentaires dans l'industrie agroalimentaire.

# ***Chapitre III***

## **Chapitre III : Risque de l'antibiorésistance dans L'industrie**

### **laitière III-1 Définition**

Le terme d'industrie laitière désigne la production et le traitement du lait (principalement de vache) et des produits comme le beurre, le fromage, le yogourt, le lait caillé, ainsi que le lait condensé et le lait en poudre dès l'époque industrielle. **(Vignola, 2002)**

### **III-2 Produits de l'industrie laitière**

Le Codex Alimentarius définit un produit laitier comme un «produit obtenu à la suite d'un traitement quelconque du lait, qui peut contenir des additifs alimentaires et autres ingrédients fonctionnellement nécessaires au traitement». La gamme de produits laitiers varie considérablement d'une région à l'autre et entre les pays d'une même région, en fonction des habitudes alimentaires, des technologies disponibles de transformation du lait, de la demande du marché et des circonstances sociales et culturelles.

Le choix du lait joue un rôle essentiel dans la diversité et la variété des produits laitiers. Ainsi, une crème ou un beurre fabriqués à partir de lait cru ne seront pas les mêmes que s'ils sont fabriqués à partir de lait écrémé. Les saveurs, les propriétés nutritives et la durée de conservation varient ainsi selon le type de lait utilisé. D'où fromages, desserts lactés ou yaourts aux goûts bien différents **(Alais, 1984)**.

### **III-3 Généralités sur le Lait**

#### **III3-1 Définition du Lait**

Le lait a été défini en 1908, au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant :

« Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum» **(Alais, 1975)**.

**Le Codex Alimentarius en 1999**, le définit comme étant la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur.

**Tableau N°03** Variation de la composition du lait d'une espèce animale à une autre, le tableau suivant donne la composition chimique des différents mammifères : ( **Alais, 1984**).

| Element en g/l          | Vache   | Chèvre | Brebis | Chamelle |
|-------------------------|---------|--------|--------|----------|
| Eau                     | 900-910 | 900    | 860    | 902      |
| Extrait sec total (est) | 125-135 | 140    | 190    | 140      |
| Matière grasse          | 35-45   | 45-50  | 70-75  | 46       |
| Matière mrotéique       | 30-36   | 35-40  | 55-60  | 36       |
| Caséine                 | 27-30   | 30-35  | 45-50  | 28       |
| Protéines solubles      | 4-5     | 6-4    | 8-10   | 8        |
| Matière minérale        | 7.8-8.2 | 8-10   | 10-12  | 7.2      |
| Lactose                 | 40-50   | 40-45  | 45-50  | 50       |

**Tableau N°04** : Caractéristiques physico-chimiques du lait ( **Alais, 1984**)

| Caractéristiques           | Données           |
|----------------------------|-------------------|
| pH (20°C)                  | 6.5 à 6.7         |
| densité (20°C)             | 1.028 à 1.036     |
| Température de congélation | -0.51°C à -0.55°C |
| Valeur énergétique         | +275KJ. (100mL)-1 |

### III-3-2 Transformation de lait

Le lait est un aliment nutritif précieux qui a une durée de vie courte et qui doit être manipulé avec soin. Le lait est très périssable, car il est un excellent milieu de croissance pour les micro-organismes - en particulier les bactéries pathogènes - qui peuvent altérer le produit et causer des maladies chez les consommateurs. La transformation du lait permet de conserver ce produit pendant plusieurs jours, semaines ou mois et de réduire l'incidence des maladies d'origine alimentaire. (**Gevers et al., 2000**)

La durée de vie utile du lait peut être prolongée pendant plusieurs jours grâce à des techniques comme le refroidissement (qui est le facteur le plus susceptible d'influer sur la qualité du lait cru) ou la fermentation. La pasteurisation est un traitement thermique qui prolonge la durée de vie du lait et réduit le nombre de micro-organismes pathogènes à des niveaux qui ne représentent pas un risque important pour la santé. Le lait peut encore être traité davantage afin de le convertir en produits laitiers à forte valeur, concentrés et facilement transportables avec une durée de vie plus longue, tels que le beurre, le fromage et le ghee.

La transformation des produits laitiers apporte aux petits producteurs laitiers des revenus plus élevés que la vente de lait cru et facilite l'accès aux marchés régionaux et urbains. La transformation du lait peut également aider à faire face aux fluctuations saisonnières de la production laitière. La transformation du lait cru en lait et produits laitiers traités peut aider des communautés entières en générant des emplois non agricoles dans le cadre de la collecte, du transport, de la transformation et de la commercialisation du lait. (Wang *et al.*, 2006).

### III-3-3 Microorganismes dans le lait

Le lait est une solution neutre, riche en substances nutritives (vitamines, minéraux, sucre, protéine, matière grasse)(tableau 03). Les microorganismes pouvant métaboliser ces substances nutritives peuvent se développer dans le lait si les conditions intrinsèques(par exemple le pH), et extrinsèques (par exemple la température) leurs sont favorables. Cependant, la composition du lait n'est pas toujours constante. Celle-ci dépend de la race de l'animal, de son stade de lactation, de son âge et de son alimentation.

A la sortie de la mamelle, le lait provenant d'un animal sain est peu contaminé. La contamination est due aux infections de l'animal et aux contaminations extérieures. La microflore du lait cru contribue à la typicité des fromages aux laits crus. On peut classer cette microflore en 3 catégories : (Vignola, 2002).

- La microflore utile, apportant une odeur, une texture et un goût particulier aux produits laitiers.
- La microflore indésirable ou d'altération, apportant des défauts aux produits laitiers en agissant sur le goût ou la texture
- La microflore potentiellement pathogène

#### III-3-3-1 Flore originelle

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10<sup>3</sup> germes/ml). A sa sortie du pis, il est pratiquement stérile et est protégé par des substances inhibitrices appelées lacténines à activité limitée dans le temps (une heure environ après la traite) .

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles (Vignola, 2002). Il s'agit de microcoques, mais aussi streptocoques lactiques et lactobacilles.

Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation (**Guiraud, 2003**) et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production (Varnam et Sutherland, 2001). Le tableau n°05 regroupe les principaux microorganismes originels du lait avec leurs proportions relatives.

**Tableau N°05 : Flore originelle du lait cru (Vignola, 2002)**

| Microorganismes              | Pourcentage (%) |
|------------------------------|-----------------|
| Micrococcus sp.              | 30-90           |
| Lactobacillus                | 10-30           |
| Streptococcus ou Lactococcus | <10             |
| Gram négatif                 | <10             |

### III-3-3-2 Flore de contamination

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (**Vignola, 2002**).

Ces contaminations par divers microorganismes peuvent provenir de l'environnement : entérobactéries, Pseudomonas, Flavobacterium, microcoques, corynébactéries, Bacillus, etc., par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière. Des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de *Clostridium*, d'entérobactéries coliformes et, éventuellement, d'entérobactéries pathogènes : *Salmonella*, *Yersinia*. Ceci explique l'importance d'un contrôle rigoureux du lait (**Leyral et Vierling, 2007**).

D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait, lorsqu'il est issu d'un animal malade. Il peut s'agir d'agents de mammites, c'est-à-dire d'infections du pis : *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium pyogenes*, staphylocoques, etc. Il peut s'agir aussi de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalies du pis : *Salmonella* ; *Brucella*, agent de la fièvre de Malte, et exceptionnellement *Listeria monocytogenes*, agent de la listériose ; *Mycobacterium bovis* et tuberculosis, agents de la tuberculose ; et quelques virus.

Hormis les maladies de la mamelle, le niveau de contamination est étroitement dépendant des conditions d'hygiène dans lesquelles sont effectuées ces manipulations, à savoir l'état de propreté de l'animal et particulièrement celui des mamelles, du milieu environnant (étable, local de traite), du trayon, du matériel de récolte du lait (seaux à traire, machines à traire) et, enfin, du matériel de conservation et de transport du lait (bidons, cuves, tanks) (FAO, 1995).

### III-3-3-3 Flore lactique

La flore lactique est une flore utile, exploitée dans de nombreux processus de transformation du lait utilisant la fermentation lactique, pour ses propriétés acidifiantes et aromatisants. Mais elle se développe rapidement dans les laits non réfrigérés (température 12-15 °C), entraînant une acidification qui compromet les possibilités de traitement thermique du lait et le rend impropre à de nombreuses fabrications dès qu'un certain niveau d'acidité est atteint.

Les principales espèces de bactérie lactiques rencontrées dans le lait et les produits laitiers appartiennent à 6 genres différents : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, et *Entérocoques*. (Vignola, 2002).

### III-4 Généralités sur les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvés dans tous types d'habitat (lait, viande, légumes...). Elles accompagnent l'activité humaine au quotidien, en tant que bactéries de la flore commensale, de la flore intestinale ou de la flore alimentaire. Une caractéristique commune permet cependant de les unifier en un seul et vaste groupe: leur capacité à fermenter les hydrates de carbone en acide lactique . Lorsque l'acide lactique est le seul produit terminal, il s'agit des bactéries lactiques homofermentaires (certaines espèces peuvent produire au moins 18 moles d'acide lactique par mole de glucose fermenté). Parfois, en plus de l'acide lactique, d'autres composés constitués principalement d'acide acétique, d'éthanol et de gaz carbonique sont produits: c'est le cas des hétérofermentaires (produisent uniquement 1 mole d'acide lactique par mole de glucose fermenté). Elles partagent aussi un certain nombre de caractéristiques communes, qui forment la base de leur classification. Ce sont des bactéries à Gram positif, asporulées, aéro-anaérobies facultatives, catalase négative, oxydase négative. Le contenu en GC de leur ADN varie de 33 à 54%, ce qui les classe dans les bactéries à faible pourcentage de GC ( Michaela *et al.*, 2009). Elles sont de métabolisme chimioorganotrophes, ce qui signifie qu'elles utilisent



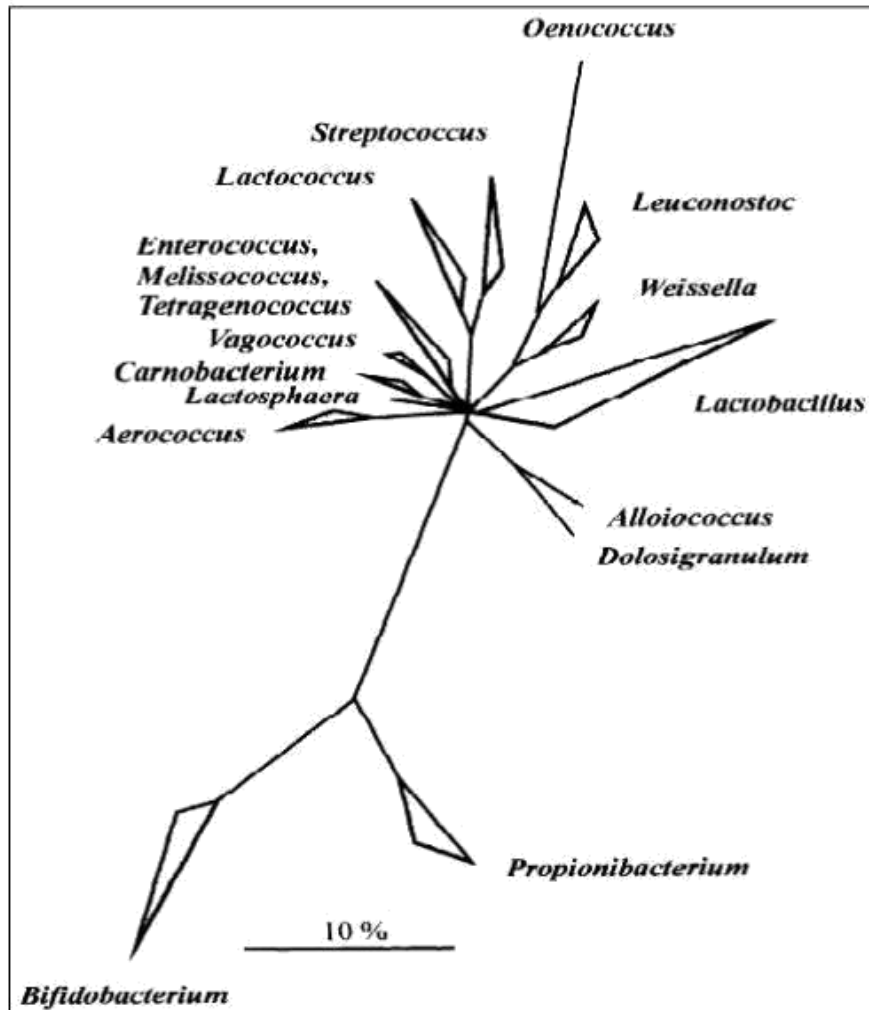
comme source énergétique des substances hydrocarbonées telles que les sucres, les alcools et les acides organiques.

Elles possèdent souvent des exigences nutritionnelles complexes en terme d'acides aminés, de peptides, de vitamines, de sels, d'acides gras et de sucre (**michaela et al.,2009**)

### **III-4-1 Classification et taxonomie**

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla- Jensen sur divers critères morphologiques et physiologiques (activités catalase et nitrite réductase, type de fermentation) .Les critères phénotypiques permettant la classification des bactéries, se sont ensuite étendus à la composition de la paroi, le type d'acides gras cellulaires, le type de quinones (accepteur d'électrons). Ainsi, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques . Cependant ces méthodes phénotypiques ne rendent pas compte des relations phylogénétiques entre les groupes. En 1977, Woese et Fox introduisent la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques 16S. Cette méthode va révolutionner la taxonomie des bactéries et la classification des bactéries lactiques va être profondément modifiée (**Buddhiman et al., 2008**). La Figure 10 montre la position phylogénétique des bactéries lactiques selon Schleifer et Ludwig (1995). Les méthodes de typage moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés (rep PCR), ainsi que les Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) et autres méthodes génotypiques comme le pourcentage en GC ou l'hybridation ADN:ADN sont aussi utilisées en classification .

L'approche de classification consistant à prendre en compte les méthodes phénotypiques et génotypiques s'appelle la taxonomie polyphasique . La technique de MLST (pour Multi Locus Sequence Typing), basée sur la divergence nucléique de gènes de ménage, est utilisée pour la classification des bactéries lactiques pathogènes notamment les streptocoques (**Enright et Spratt., 1999**). Cependant cette technique n'a pas été utilisée pour d'autres bactéries lactiques.



**Figure N° 10** : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).

Le groupe des bactéries lactiques ne peut pas être considéré comme un groupe phylogénétique. Elles appartiennent toutes au groupe des bactéries à Gram positif, mais si la plupart d'entre elles appartiennent au groupe des bactéries à Gram positif à bas G+C (phylum des Firmicutes), le genre *Bifidobacterium* appartient au groupe des bactéries à Gram positif à haut G+C (phylum des Actinomycètes) . Si les Bifidobactéries sont phylogénétiquement éloignées des bactéries lactiques à bas G+C, elles sont tout de même traditionnellement incluses dans les bactéries lactiques car elles partagent certaines caractéristiques avec elles car elles produisent de l'acide lactique et sont utilisées dans les laits fermentés .

Parmi les bactéries lactiques à bas G+C, on peut distinguer quatre groupes phylogénétiques principaux. Les genres *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* et *Aerococcus* forment un premier groupe (Stiles

**et Holzapfel, 1997).** Dans ce groupe, l'effort de séquençage des génomes a porté sur les espèces pathogènes opportunistes de l'homme, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*.

Les genres *Streptococcus* et *Lactococcus* n'ont été séparés qu'en 1985 avec l'apparition du genre *Lactococcus* (**Schleifer et al., 1985**) et sont phylogénétiquement proches. *Lactococcus lactis* est une bactérie très utilisée en fermentation fromagère. Le premier génome de bactéries lactiques disponible a été celui d'une souche de *Lactococcus lactis ssp. lactis* en 2001. Dans le genre *Streptococcus*, la seule espèce utilisée comme ferment dans l'industrie alimentaire est *St. thermophilus*, notamment pour la production de yaourt avec *Lb. bulgaricus*. Ce genre *Streptococcus* contient un grand nombre de bactéries plus ou moins pathogènes (*St. pneumoniae*, *St. pyogenes*, *St. mutans*, *St. agalactiae*...) pour lesquels 13 séquences génomiques sont disponibles.

Le troisième groupe de bactéries lactiques est formé des genres *Oenococcus*, *Leuconostoc* et *Weissella*. Dans ce groupe, on retrouve des bactéries très utilisées dans l'industrie agroalimentaire comme *Oenococcus oeni*, bactérie importante dans la production de vin pour la fermentation malolactique ou *Leuconostoc citreum* utilisé pour la fermentation de certains légumes et *Lc. mesenteroides ssp. mesenteroides* utilisé dans la production de choucroute et de dextran. Enfin, le dernier groupe phylogénétique des bactéries lactiques est constitué des genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*.

### **III-4-2 Habitat et origine des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des aliments ensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (**Vignola, 2002**).

### **III-4-3 Utilisation industrielle des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont très utilisées dans l'industrie agroalimentaire. Elles peuvent fermenter une grande variété de substrats (Tableau 06).

Les bactéries lactiques ont plusieurs rôles dans la production de produits fermentés (**Smit et al., 2005**). Tout d'abord, elles vont permettre de changer la saveur de l'aliment et sa texture. Ces changements sont dus notamment à l'acide lactique produit au cours de la croissance. D'autre part, elles produisent des peptides et des molécules comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde,

le diacétyle ou l'éthanol qui sont importants pour la saveur des aliments. Un autre rôle des bactéries lactiques est d'inhiber le développement de la flore bactérienne indésirable qu'elle soit pathogène ou d'altération. Cette inhibition passe par deux aspects: l'acidification qui inhibe la croissance des bactéries peu résistantes à un bas pH, et la synthèse de bactériocines, molécules bactéricides dont les spectres d'action sont variables sur des bactéries à Gram positives comme la nisine et caséine 80 (**Rammelsberg et al., 1990**).

**Tableau N°06:** Principaux produits issus de la fermentation des bactéries

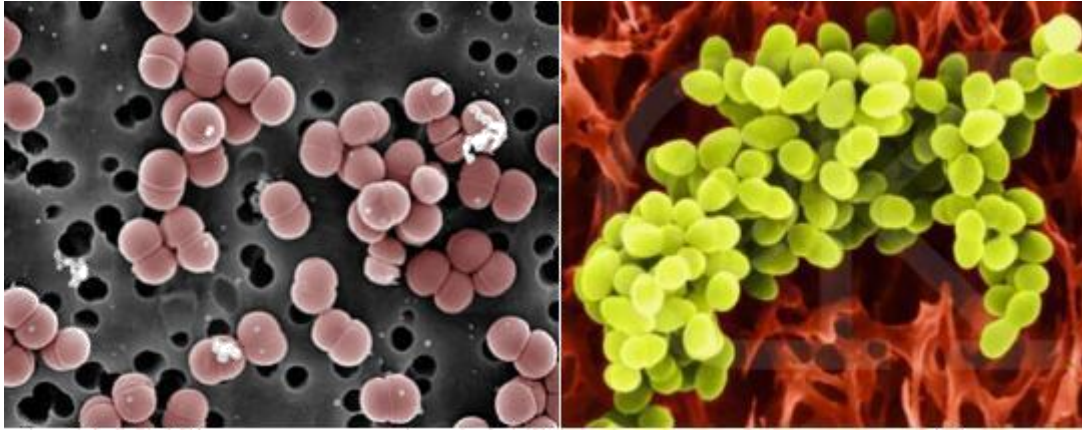
| Genre                  | Substrat | Exemples de produits                          |
|------------------------|----------|---|
| <i>Bifidobacterium</i> | Lait     | laits fermentés                               |
| <i>Lactobacillus</i>   | Lait     | yaourts, laits fermentés, kéfirs, fromages    |
|                        | Viande   | saucissons secs, jambons secs                 |
|                        | Végétaux | choucroute, olives, "yaourts" au lait de soja |
|                        | Céréales | pain au levain, bières                        |
| <i>Lactococcus</i>     | Lait     | fromages, kéfirs                              |
| <i>Leuconostoc</i>     | Végétaux | choucroute, olives, vin                       |
|                        | Lait     | fromages, kéfirs                              |
| <i>Pediococcus</i>     | Végétaux | Choucroute                                    |
|                        | Viande   | saucisses semi-séchées                        |
| <i>Oenococcus</i>      | Végétaux | Vin   |
| <i>Streptococcus</i>   | Lait     | yaourts, laits fermentés, fromages            |

#### III-4-4 Problème de l'antibiorésistance chez les bactéries lactiques

Des études récentes décrivent que plus de 1000 espèces bactériennes colonisent le tractus gastro-intestinal humaines et animales , y compris les bactéries commensales et pathogènes, Les bactéries lactiques représentent la plupart de ces bactéries naturellement présentes dans cet écosystème et constituent la plus grande densité cellulaire décrite jusqu'à aujourd'hui (10<sup>15</sup> ), nombre supérieur au nombre total de cellules humaines constituant l'organisme . Elles sont susceptibles d'être retrouvés naturellement dans tous types d'environnement (lait, viande, légumes, sol...), comme elles peuvent être aussi largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire ou utiliser comme probiotique( **Ammor et al., 2007**).

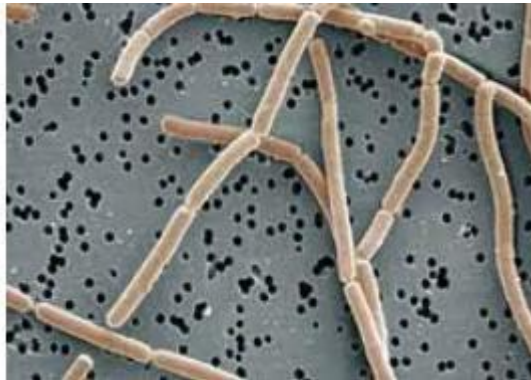
La résistance aux antibiotiques pour ces espèces bactériennes pourrait être bénéfique pour l'hôte (humain ou animal) en aidant à maintenir l'équilibre dans le tractus gastro-intestinal en cas de diarrhée causée par un traitement d'antibiotiques. Cependant, il y a un grand risque associé à la capacité de transmettre les facteurs de résistance (gènes) horizontalement à d'autres bactéries commensales ou pathogènes (**Teuber *et al.*, 1999**). De nombreux articles scientifiques rapportent que les gènes de résistance aux antibiotiques trouvés chez les agents pathogènes de l'homme sont identiques à ceux trouvés chez les bactéries lactiques . Chez *Listeria innocua* la résistance acquise à la tétracycline est la conséquence d'un transfert horizontal par conjugaison du plasmide conjugatif pRE25 originaire d'*Enterococcus faecalis* ou *Streptococcus* . Chez *Neisseria meningitidis* cette résistance est due à un autre plasmide qui porte le gène *tetM* trouvé chez les lactobacilles .Les espèces de bactéries lactiques peuvent donc agir comme des "réservoirs" de gènes de résistance transmissibles aux bactéries colonisant le tractus gastro-intestinal humain *via* la chaîne alimentaire ( **Ammor *et al.*, 2007**).

Selon le Groupe FEEDAP (additifs et produits ou substances utilisés dans alimentation animale) de EFSA (European Food Safety Authority), toutes les bactéries destinées à être utilisées comme additifs alimentaires ou même dans l'industrie agroalimentaire en Europe ne doivent porter aucune forme d'antibiorésistance, la sensibilité de ces bactéries à un éventail d'antibiotiques doit être examinée avant toute utilisation . L'utilisation abusive d'antibiotiques ou comme promoteurs de croissance dans l'élevage est interdite , en raison de leur potentiel à propager les gènes de résistance aux agents pathogènes humains comme *Listeria* et certains pathogènes d'*E. coli* (**Teuber et Perreten, 2000**).

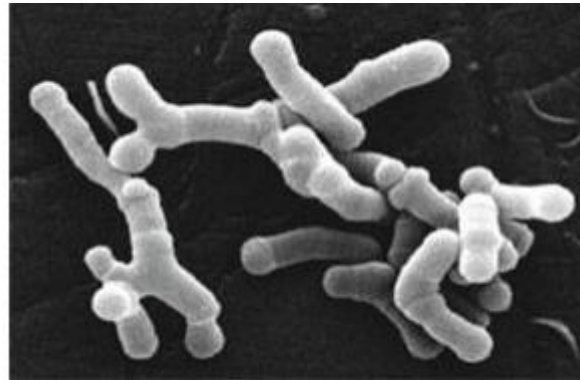


**Figure N°11** :*pediococcus* au microscope  
Électronique

**figure N°12** :*lactococcus lactis subsp lactis*  
au microscope Électronique



**Figure N°13** :*lactobacillus acidophilus* au  
Microscope électronique



**figure N°14**:*bifidobacterium bifidum* au  
microscope électronique

[www.bioweb.usu.edu](http://www.bioweb.usu.edu)

### **III-4-5 Acquisition et diffusion de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries lactiques**

La mutation génétique et le transfert horizontal de gènes permettent aux espèces de s'adapter rapidement aux différents stress dans un environnement . Le transfert horizontal comme nous avons déjà cité est un des mécanismes actifs pour acquérir de nouvel phénotype résistant . Des études récentes ont montré que les produits alimentaires fermentés peuvent causer des risques de santé publique, ils sont considérés comme vecteurs de gènes de résistances aux antibiotiques qui pourraient être transférés horizontalement aux bactéries pathogènes au sein d'un écosystème microbien tel que la partie gastro-intestinale humaine ou animale ( **Klein et al., 2000**).

Les bactéries lactiques comme toutes les autres bactéries peuvent acquérir de nouveau gènes généralement par les trois mécanismes naturels de transfert génétiques, transformation, transduction et conjugaison précédemment décrits .

La transformation naturelle a été observée chez de nombreuses archae bactéries mais chez les bactéries lactiques la compétence naturelle n'a été démontré que chez quelques souches de *Leuconostoc carnosum* (**Helmark et al., 2004** ). Le phénomène de *transduction* a seulement été observé chez quelques souches de lactobacilles comme *Lb. salivarius* et *Lb. acidophilus* chez qui il a été démontré que des gènes plasmidiques ont pu être transduits par un mécanisme d'empaquetage des molécules d'ADN plasmidiques à la place d'ADN phagique . Pour cette raison la transduction est devenu une des premières techniques utilisées pour le transfert des gènes technologiquement utiles entre différentes souches de bactéries lactiques (**Gasson et Shearman, 2003**).

On considère en général les bactéries lactiques ont probablement acquis la plupart des gènes de résistances aux antibiotiques par *conjugaison*, à l'aide de plasmides ou de transposons conjugatifs.

#### **III-4-5-1 Modifications spontanées du génome des bactéries**

##### **lactiques III-4-5-1-1 Chromosome des bactéries lactiques**

Les données concernant le génome des bactéries lactiques ont considérablement progressé ces dernières années, en particulier grâce aux programmes de séquençage génomique. Avant ces travaux, la taille des génomes des bactéries lactiques avait été estimée

entre 1,8 et 3,4 Mb selon les espèces, par la technique d'électrophorèse en champ pulsé. La première séquence d'un génome de bactéries lactiques a été publiée en 2001.

Différents types de modifications, sans apport d'ADN étranger, peuvent survenir spontanément sur le chromosome. Ces modifications peuvent être ponctuelles, comme des mutations, ou au contraire, impliquer des réarrangements importants du chromosome. Ces modifications génomiques peuvent causer des résistances aux antibiotiques transmissibles verticalement aux générations. **(Daveran-Mignot *et al.*, 1998).**

Les réarrangements génomiques spontanés peuvent être provoqués par des éléments génétiques tels que les phages tempérés, les transposons conjugatifs, les IS (séquences d'insertion) ainsi que les séquences répétées qui peuvent provoquer des réactions de recombinaison homologues. Les réarrangements due à des recombinaisons homologues, tels que les IS, ont été décrits chez les bactéries lactiques, en particulier chez *Lc. lactis*. L'un des premiers remaniements majeurs, une inversion couvrant environ la moitié du chromosome, a été mise en évidence par la comparaison des cartes physiques des chromosomes de *Lc. lactis* IL 1403 et MG1363. Cette inversion serait due à un événement de recombinaison entre deux IS **(Daveran-Mignot *et al.*, 1998).**

### **III-4-5-1-2 Eléments génétiques mobiles**

- **Séquences d'insertion (IS)**

L'un des éléments intégratifs les plus simples est l'IS (pour « insertion sequence »). Ces petits éléments, d'une taille généralement inférieure à 2,5 kb, codent seulement pour les protéines dont la fonction est requise pour leur mobilité. Il en existe des centaines de variétés dans le monde bactérien . Ces éléments ont un rôle essentiel dans l'évolution des génomes et leur activité est fortement contrôlée afin de ne pas perturber le fonctionnement de la cellule . Leur variété et le nombre de répétitions d'éléments semblables varient en fonction des génomes, mais aussi entre différentes souches au sein d'une même espèce. Ainsi, des analyses génomiques ont montré que *Lb. gasseri* ATCC33323 contient 3 IS de types différentes, *Lb. acidophilus* ATCC700396, six copies de l'IS3, *Lb. plantarum* WCFS1, 12 IS de deux types, *Lb. sakei* 23K, 12 IS de trois types et *Lc. lactis* MG1363, 92 IS de six types. **(Gasson, 1990).** Les IS sont une source importante de nouvelles mutations en raison de leur nombre variable et dans différents endroits au sein des génomes bactériens . La mutatio médiée par une IS peut causer des réarrangements génomiques et/ou divers effets sur l'expression des gènes . Certains auteurs ont signalé que la transposition peut se produire à des taux plus élevés chez les



bactéries sous diverses conditions de stress comme l'effet stressant d'un antibiotique ( **Twiss et al., 2005**), mais elle peut aussi être produite dans des environnements en absence de tout stress extérieur . Les IS contribuent à l'adaptation des bactéries dans un environnement par réarrangements génétiques lors d'une transposition (**Gasson et Shearman, 2003**).

- **Plasmides des bactéries lactiques**

Des plasmides ont été isolés de souches appartenant à de nombreuses espèces de bactéries lactiques, et dans tous les genres. Cependant, leur distribution est très variable, tant au niveau des souches au sein d'une espèce, que, plus globalement, au niveau des genres. Bien que les plasmides ne sont pas des éléments indispensables à la survie des bactéries, ils peuvent porter des gènes qui sont essentiels pour l'adaptation dans des conditions environnementales particulières.

La présence de plasmides chez les *Lactocoques* a d'abord été rapportée par . Ces plasmides sont couramment trouvés avec des fréquences élevées chez les Entérocoques, Lactocoques, Leuconostocs, Pédicoques et rarement trouvés chez certaines souches de Lactobacilles et Bifidobactéries (**Mathur et Singh, 2005**). Généralement les plasmides des bactéries lactiques ont été associés à la fermentation du lactose , l'activité citrate perméase , l'activité protéolytique , la résistance aux antibiotiques , la résistance aux phages ou par inhibition de l'ARN anti-sens , la production de bactériocines , et le transfert conjugatif (**Gasson et Shearman, 2003**). Néanmoins, la plupart des plasmides dans le genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* restent mal connus (**Gasson et Shearman, 2003**). Wang et Lee (1997) ont signalé qu'environ 38% des espèces de *Lactobacillus* contiennent des plasmides de tailles différentes (de 1,2 à 150 kb) et en nombres variables (1 ou plus).

- **Plasmides conjugatifs des bactéries lactiques**

Un plasmide conjugatif est un plasmide autotransférable codant pour toutes les fonctions nécessaires pour son transfert entre les différentes cellules par conjugaison, généralement ces éléments transférables ont une taille supérieure à 30kb (**Gfeller et al.,2003**).

Le plasmide conjugatif de la souche *Lc. lactis* est le premier découvert chez les bactéries lactiques. Il code pour l'utilisation de lactose et/ou activité protéolytique . Cependant aucun gène de résistance aux antibiotiques n'a été localisé sur les plasmides conjugatifs naturels des bactéries lactiques. Ces plasmides conjugatifs se trouvent couramment dans les cultures

starter comme chez les *Lactocoques* et peuvent être transférés aux autres souches bénéfiques à des fréquences aussi élevées que  $10^{-2}$ .

Les plasmides conjugatifs sont communs chez les Lactocoques, les Leuconostocs, les Pédiocoques et quelques espèces de Lactobacilles (**gfeller et al.,2003**). Cependant, ils sont rares chez *Bifidobacterium*, les autres espèces de *Lactobacillus* et des souches de *St. thermophilus*.

La résistance acquise aux antibiotiques chez les bactéries lactiques a été assurée grâce aux transferts horizontaux par conjugaison des plasmides de différentes espèces. Le plasmide conjugatif pAM $\square$ 1 d'*Ec. faecalis* était par exemple identifié chez différentes souches de *Lb. reuteri*. Le potentiel du transfert de ce plasmide à autres souches d'*Enterococcus* et de *Lactobacillus* a été étudié *in vitro* et *in vivo* dans le tractus gastro-intestinal des rongeurs.

La capacité de transfert a été trouvée pour le plasmide conjugatif pIP501 de *St. agalactiae* qui code pour la résistance à l'érythromycine et le plasmide pRE25 d'*Et. faecalis* qui code pour la résistance à 12 antibiotiques (chloramphenicol, cinq macrolides différents, deux lincosamides, trois aminoglycosides et à la streptothricine) (**Schwarz et al., 2001**). Un autre plasmide conjugatif, pK214, trouvé dans une sous-espèce de *Lc. lactis* isolée du fromage à pâte molle de lait cru montre une origine de répliation typique pour *Lactococcus*. Il code pour quatre gènes de résistance : *tetS* (tétracycline), *cat* (Chloramphénicol), *str* (Streptomycine) et *mdtA* (protéine à efflux assurant une résistance multiple). Un autre plasmide conjugatif, pMD5057, qui code pour la résistance à latétracycline était identifié chez *Lb. plantarum*. Chez *Lb. fermentum* un autre plasmide conjugatif, pLME300, a été identifié, ce plasmide code pour la résistance a l'érythromycine, novobiocine et dalfopristine streptogramine. Le plasmide pAM<sub>B</sub> 1 de *St. lactis* codant pour la résistance à l'érythromycine, est largement diffusé entre différentes espèces de *Lactobacillus* (*Lb. reuteri*, *Lb. murinus*, et *Lb.fermentum*) (**Gfeller et al.,2003**)

- **Transposons conjugatifs des bactéries lactiques**

limitée au sein d'un génome, en absence d'homologie de séquence nucléotidique (recombinaison illégitime). Les gènes qui s'additionnent de cette manière sont dits transposables et s'organisent en structures appelées transposons (Tn) qui portent les déterminants de la transposition, une intégrase et une excisionase, lesquelles permettent une recombinaison des extrémités du transposon avec leur cible sur le chromosome ou plasmide

(Gasson et Shearman, 2003 ). Ils codent, de plus pour un ensemble de gènes permettant le transfert par conjugaison et d'autres fonctions, par exemple la résistance aux antibiotiques. La taille des transposons conjugatifs chez les bactéries lactiques varie entre 16 et 70 kb. Ils peuvent être insérés dans des plasmides ou le chromosome, en une ou plusieurs copies. Ils peuvent mobiliser des plasmides ou des gènes chromosomiques. Ces transposons ont été découverts dans plusieurs souches : *Et. faecalis* (Tn916, Tn918, Tn920, Tn925, Tn2702), *Et. faecium* (Tn5233) (Huys *et al.*, 2004; Perreten *et al.*, 1997b), *St. pyogenes* (Tn3701), *St. Agalactiae* (Tn93951), et *Lc. lactis* (Tn5276, Tn5301). Chez les Enterocoques et les Streptocoques, ces transposons codent des résistances à la tétracycline (*tetM*), l'érythromycine (*erm*), le chloramphénicol (*cat*), et la kanamycine (*APHA-3*). Chez les Lactocoques, essentiellement *Lc. nisini* les transposons s'intègrent dans au moins cinq sites chromosomiques ; ils peuvent porter des gènes codant pour une bactériocine, la nisine) (*nis*), des gènes de résistance et des gènes pour la fermentation du saccharose (*sac*) (Rauch et de Vos, 1992, 1994).

Les transposons conjugatifs, tels ceux de la famille Tn916/Tn1545, ont un large spectre d'hôte : ils peuvent circuler entre différentes souches bactériennes, bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif, des genres *Acetobacterium*, *Acholeplasma*, *Actinobacillus*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Butyrivibrio*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Haemophilus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Mycoplasma*, *Neiseria*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* (Klein *et al.*, 2000).

# *Chapitre IV*

## Chapitre IV : Résistance aux antibiotiques dans les produits de fromage

### IV-1 Introduction

Les Produits laitiers fermentés, surtout les fromages, sont les principaux produits laitiers et largement consommés dans de nombreux pays . Cependant, la plupart des échantillons de fromage vente au détail examinés en 2004-2005 contenaient un nombre très élevé de bactéries résistantes aux antibiotiques (**Wang et al., 2006**). Transporteurs de gènes de l'antibiorésistance ont identifiés incluent *Staphylococcus SP.*, *Streptococcus spp.*, ainsi que les organismes utilisés couramment comme ferments à la fermentation, comme *S. thermophilus* et *L. lactis* . Une étude de quantification d'un pool de gènes de l'antibiorésistance dans les échantillons de fromage au détail a révélé que 7 des 11 échantillons contenaient jusqu'à 107 copies du gène tetS par gramme de fromage (**mayssa et coll., 2007**). Le lait lui-même est riche en éléments nutritifs et sensibles à la contamination microbienne . L'inoculation et la croissance rapide des ferments lactiques dans le lait est essentiel à la fromagerie pour contrôler avec succès l'excroissance de la détérioration et des bactéries pathogènes pour la préservation des matières périssables

une grande variété de produits fromagers résultent d'une combinaison de différentes De diverses cultures de départ et adjuvantes , les procédures de fabrication et les conditions de traitement. Il est déconcertant qu'un grand nombre d' études récentes sur l'antibiorésistance dans les fromages, surtout fromages spécialisés en Europe ont été documentées et la plupart des isolats résistants aux antibiotiques appartenaient au laboratoire, comme *Enterococcus spp* , *S. thermophilus* (**Rizzotti et coll., 2009**), *Lactococcus spp* (**Wang et al., 2006** ). Autres bactéries commensales, telles que *Staphylococcus aureus* et entérobactéries ont également été signalés. Ces études démontrent que la contamination par l'antibiorésistance dans les produits du fromage est un problème sérieux. Contrôler et minimiser l'antibiorésistance dans la fabrication du fromage a donc le potentiel pour réduire l'exposition à l'antibiorésistance tout au long de la chaîne alimentaire

### IV-2 Fromages

#### IV-2-1 Définition

«Le mot fromage est réservé au produit fermenté ou non, obtenu par égouttage après la coagulation du lait partiellement ou totalement écrémé, ou de leur mélange, ainsi qu'au produit obtenu par concentration partielle du lactosérum ou du babeurre, à l'exclusion, dans tous les cas, de l'addition de matière grasse étrangère au lait» (**Rizzotti et coll., 2009** ).

La classification des fromages selon la norme n°A-6 est donnée au tableau 07. Elle est complétée par des normes individuelles précisant les caractéristiques particulières de divers fromages. De nombreux pays possèdent une réglementation propre concernant, notamment, la définition et la composition des produits

**Tableau N°07:** Classification des fromages en fonction de la consistance, de la teneur en matière grasse et des principales caractéristiques d'affinage (**Brule et al., 1997**).

| Formule I |                                 | Formule II |                                | Formule III   |
|-----------|---------------------------------|------------|--------------------------------|---|
| TEFD*(%)  | Premier élément de dénomination | MGES** (%) | Second élément de dénomination | Dénomination d'après les principales caractéristiques d'affinage  |
| <51       | Pâté extra-dure                 | >60        | Extra-gras                     | 1. Affiné:  |
| 49-56     | Pâte dure                       | 45-60      | Tout-gras                      | a principalement en surface   |
| 54-63     | Pâte demi-duré                  | 25-45      | Mi-gras                        | b. principalement dans la masse   |
| 61-69     | Pâte demi-molle                 | 10-25      | Quart-gras                     |   |
| >67       | Pâte molle                      | <10        | Maigre                         | 2. Affiné aux moisissures<br>a. principalement en surface<br>b. principalement dans la masse<br>3. Frais. |

\*TEFD = Pourcentage de la teneur en eau dans le fromage dégraissé c'est-à-dire : (Poids de l'eau dans le fromage) x 100 / (Poids total du fromage - Matière grasse dans le fromage)

\*\*MGES = Pourcentage de la matière grasse dans l'extrait sec c'est-à-dire : (Teneur en matière grasse du fromage x 100) / (Poids total du fromage - Eau dans le fromage).

#### IV-2 -2 Principales étapes de la fabrication des fromages

La fabrication fromagère peut être considérée comme un phénomène d'agglomération, correspondant à une synérèse, associée à un phénomène d'écoulement. Il s'agit de l'agglomération des éléments protéiques du lait, de la caséine principalement, plus ou moins modifiées, qui emprisonnent les autres constituants et, ensuite, de l'agglomération de morceaux de caillé moulés. Ce phénomène d'agglomération est associé à celui d'un écoulement de la phase liquide, composée de l'eau du lait et des éléments solubles emprisonnée dans des pores, puis libérée (**Brule et al., 1997**).

Habituellement la fabrication du fromage comprend trois étapes : La formation d'un gel de caséines, c'est la coagulation du lait ; la déshydratation partielle du gel, c'est l'égouttage qui aboutit à un caillé et le salage. Ces étapes concernent les fromages frais. Le reste des fromages subissent en plus une étape d'affinage, ce sont les fromages affinés (Camembert, Roquefort, Gouda, Tulum,...).

#### **IV-2-2-1 Coagulation du lait**

La coagulation du lait résulte de l'association des micelles de caséine plus au moins modifiées. Cette agglomération mène à la formation d'un coagulum dont le volume est égal à celui du lait mis en œuvre. Ces modifications physico-chimiques des caséines sont induites soit par acidification soit par action d'enzymes coagulantes .

L'acidification du lait peut être obtenue par les produits de fermentation de bactéries acidifiantes ou par des composés chimiques d'action acidifiante directe ou indirecte. La diminution concomitante du pH a pour effet de faire régresser l'ionisation des fonctions acides des caséines induisant le déplacement progressif du calcium et du phosphate inorganique de la micelle vers la phase aqueuse. Ceci induit la désorganisation des micelles et une réorganisation des sous unités micellaires (**Brule et al., 1997**). L'acidification microbienne du lait est un processus progressif, lent et uniforme. Il est caractérisé par des difficultés liées à la maîtrise du développement microbien (cinétique de multiplication, état physiologique, facteurs de croissance, produits de métabolismes et autres). Le coagulum édifié est un ensemble de flocons caséiniques emboîtés les uns sur les autres . Le taux et l'importance de l'acidification influencent la texture du gel en contrôlant son taux de déminéralisation. Le gel acide obtenu est friable, lisse et homogène.

Dans la coagulation enzymatique, plusieurs enzymes protéolytiques d'origine animale (veau, taurillons, porc et poulets), végétale (artichaut, chardon) et microbienne (*Kluyvermyces*, *Mucor miehi*, *Mucorpusillus* et *Endothia parasitica*) sont utilisés ( **Ramet, 1987** ). L'enzyme la plus fréquente en fromagerie est la présure, sécrétée dans la caillette des jeunes ruminants nourris au lait. Son mécanisme d'action fait apparaître trois étapes ( **Brule et al., 1997** ) : hydrolyse enzymatique de la liaison peptidique phe105-Met106 de la caséine k, ensuite agrégation des micelles de caséines déstabilisées et puis développement d'un réseau par réticulation et formation d'un gel. Les gels obtenus sont élastiques et peu friables. Leur raffermissement est rapide et important par rapport au gel lactique. Leur porosité est bonne, mais leur imperméabilité est forte (**Ramet, 1987**).

#### **IV-2-2-2 Egouttage**

L'égouttage est un phénomène dynamique qui se caractérise par la quantité de lactosérum éliminé durant le temps. En effet, il fixe les caractéristiques physiques (pH et aw) et chimique du caillé et par conséquent l'affinage du fromage (**Brule et al., 1997**).

Le processus d'égouttage est lié à des facteurs directs correspondant à des traitements de types mécanique et thermique, des facteurs indirects (acidification et coagulation enzymatique) et des facteurs liés à la matière première (richesse en caséine laitière, en protéines solubles et en matière grasse) (**Ramet , 1987**).

#### **IV-2-2-3 Salage**

En fromagerie, le salage est une phase indispensable de la fabrication des produits affinés. La teneur en sel des fromages varie selon le type de fromage, en moyenne elle est de 0,5-2 g/100 g dans la plupart des fromages, dans certains cas (les fromages bleus et quelques fromages de chèvres), elle peut s'élever à 3-4 g/100g. Par contre, certains fromages orientaux conservés en saumure ont des teneurs assez élevées (8-15 g/100 g). Les modalités de salage sont par saumurages (Emmental, et Camembert), salage à sec et salage en masse . Le salage en masse est utilisé dans les fabrications traditionnelles de quelques fromages typiques du bassin méditerrané. Il permet la préservation du lait, prolonge les phases de coagulation et d'égouttage du fromage (**Ramet, 1987**).

Le sel permet d'atteindre l'humidité appropriée du fromage (**Ponce de Leon Gongalez et al., 2000**). Il exerce, selon sa concentration, une action microbienne sélective et un effet inhibiteur sur l'activité des enzymes. A titre d'exemple, la croissance des bactéries lactiques des levains est inhibée à une teneur en sel supérieure à 2,5 g/100 g, est pratiquement nulle au-dessus de 5 g/100 g. P. roqueforti subit une inhibition de la germination des spores pour des taux de 3-6 g/100 g. L'effet du sel sur le développement de la flore microbienne des fromages ne peut toutefois être apprécié pleinement qu'en tenant compte de la tolérance des microorganismes au sel dans le milieu fromage et de la teneur en sel de la pâte fromagère (**Brule et al., 1997**).

#### **IV-2-2-4 Affinage des fromages**

L'affinage est l'étape la plus complexe de la fabrication des fromages maturés qui dépend de chaque caractéristique physico-chimique ou microbiologique du fromage . C'est un processus biochimique complexe et long qui correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants du caillé par les différents agents (**Brule et al., 1997**). Le



fromage devient donc le siège de différentes dégradations qui s'effectuent simultanément ou successivement aboutissant à la libération de substances sapides et odorantes en même temps que la modification de la texture ((**Ponce de Leon Gongalez et al., 2000** ). Le fromage est ainsi comparé à un bioréacteur complexe dont le praticien devra maîtriser l'évolution pour la porter vers les caractéristiques optimales recherchées (**Ramet, 1987**). La durée d'affinage varie selon le fromage, elle dure quelques semaines à deux ans ou plus à des températures spécifiques pour les différents types de fromages (**Brule et al., 1997**).

### **IV-3 Agents d'affinage des fromages**

Les agents responsables de l'affinage des fromages sont les enzymes. Selon **Fox et al. (1994)** quatre ou éventuellement cinq agents sont impliqués dans la maturation des fromages :

- (1) La présure ou substitut de présure (la pepsine ou protéases microbiennes)
- (2) Les enzymes indigènes du lait, très importants dans les fromages au lait cru
- (3) Les ferments lactiques et leurs enzymes, qui sont libérés après que les cellules sont mortes et lysées
- (4) Les enzymes des ferments secondaires (par exemple des bactéries propionique, *Brevibacterium linens*, les levures et les moisissures, comme *Penicillium roqueforti* et *P.candidum*) sont très importantes dans certaines variétés de fromage;
- (5) Les autres bactéries outre que ceux des ferments (NSLAB), c'est à dire les microorganismes qui ont survi suite à la pasteurisation du lait de fromagerie ou contaminant le lait ou le caillé après. Ces microorganismes après mort et lyse agissent avec leurs enzymes libérés dans le fromage

#### **IV-3-1 Microorganismes d'affinage**

Le fromage est le siège d'un développement important de microorganismes. Ces microorganismes appartiennent à des groupes ou des espèces très diverses et sont originaires de plusieurs sources : le lait, les levains, le sel ou les saumures, le matériel de la fromagerie, l'atmosphère des locaux... (**Ponce de Leon Gongalez et al., 2000**). Chaque type de fromage est cependant caractérisé par une microflore et des équilibres microbiens qui lui sont propres. La diversité de la flore et son évolution au cours de l'affinage contribuent à la complexité du processus et rendent ainsi son étude très difficile. Selon **Fox et al. (1994)**, l'objectif de l'étude de la microbiologie des fromages est de développer une vision claire de la

microflore et de son évolution. Il est important de surveiller la flore totale ainsi qu'identifier et caractériser les composants individuels. Les techniques disponibles pour l'étude de la microbiologie des fromages peuvent être divisés en trois groupes : (1) les méthodes qui dépendent de la culture suivie par la caractérisation phénotypique ; (2) méthodes qui dépendent de la culture suivie par caractérisation moléculaire ; et (3) des procédés qui dépendront seulement de la caractérisation moléculaire. Les deux catégories des microorganismes des fromages sont la flore des ferments lactiques et la flore secondaire. Les bactéries des ferments lactiques sont impliquées à la fois dans l'acidification et dans la maturation des fromages alors que la flore secondaire est principalement impliquée dans l'affinage. Cette dernière regroupe les bactéries lactiques originaires désignées par NSLAB (Non-Starters Lactic Acid Bacteria) et les autres bactéries (bactéries de surface et bactéries propénoïques), les levures et/ ou les moisissures (**Brule et al., 1997**). Les équilibres entre les différents groupes microbiens et, par suite, l'importance relative des populations, peuvent être fortement modifiés; certaines espèces ou certains groupes se multiplient activement alors que d'autres tendent peu à peu à disparaître. Ainsi un groupe microbien resté inactif peut à un moment donné de l'affinage jouer un rôle déterminant grâce à l'évolution du substrat . Dans le fromage Parmigiano Reggiano, cette flore qui est initialement d'une charge de  $10^2$  UFC/g atteint  $10^6$  -  $10^7$  UFC/g après 3 à 9 mois d'affinage et devient la flore dominante (**Ponce de Leon Gongalez et al., 2000**).

Concernant les bactéries lactiques, il apparaît clairement qu'elle joue, par leurs propriétés acidifiantes et protéolytiques, un rôle fondamental dans les processus de transformation du lait en caillé et du caillé en fromage affiné. La dégradation des protéines constitue le phénomène majeur de l'affinage puisqu'elle améliore la texture et la digestibilité du caillé . De plus, par les peptides et les acides aminés produits, elle participe au développement de la saveur et de l'arôme ou des précurseurs d'arômes des fromages affinés . Selon **Rizzotti et coll, (2009)** les bactéries majeurs de cette flore comprennent des souches, plus ou moins, acidifiantes telles que *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, et *Enterococcus spp.*, ainsi que quelques espèces de lactobacilles NSLAB (*Leuconostoc spp.*, *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. salivarius*, et *Lb. rhamnosus*). Entre autres les études sur différents types de fromages au lait cru montrent une grande diversité de BL selon les genres et les espèces vue leur capacité à croître dans des environnements pauvres en sucre et hostiles (**Rizzotti et coll., 2009**).

#### **IV-4 Contamination des fromages par des microorganismes résistants aux antibiotiques pendant les stades de fabrication et la dynamique microbienne**

La fermentation lactique en particulier dans la fromagerie, est un processus complexe impliquant des changements avancés en microbiologie et en chimie. La Fabrication du fromage nécessite plusieurs étapes, comme la pasteurisation, fermentation du lait, coagulation, séchage, pressage, salage et affinage.

Plusieurs facteurs contribuent aux changements de dynamiques microbiennes engagés dans le processus de fabrication du fromage. Ces facteurs comprennent les ingrédients, tels que lait, cultures initiales et adjuvantes, ainsi que les procédures de traitement, comme la pasteurisation, salage, fermentation et maturation. Le Lait cru, sécrété par des vaches en bonne santé, est exempt de micro-organismes avant sa traite. Cependant, il est souvent contaminé par différents contaminants pendant tous les processus avant de recevoir. Sol, laiterie, Matériel de laiterie, de fumier, d'alimentation et lors de la traite. Le transfert et les processus de traitement peuvent être les sources de contamination. Étant donné que le lait est très nutritif, les microbes peuvent se développer rapidement, en particulier au-dessus de la température de réfrigération. (Wang *et al.*, 2006)

##### **IV-4-1 Contamination au stade de pasteurisation**

Le Lait cru peut contenir un nombre élevé de bactéries, y compris les commensaux et les agents pathogènes avant pasteurisation. La pasteurisation détruit les bactéries d'altération et les bactéries pathogènes sensibles à la chaleur dans le lait cru. Les conditions de pasteurisation sont 15 s à 71,7 ° C ou 30 min à 62,7 ° C, ce qui réduit la charge bactérienne dans le lait ; mais les bactéries thermophiles qui survivent à la pasteurisation et la contamination après pasteurisation, d'équipement, peuvent encore provoquer l'altération. Certaines bactéries peuvent également récupérer après la pasteurisation. La Flore qui survit au la traitement thermique peut être donc une source potentielle résistante aux antibiotiques trouvée dans les produits finaux (Wang *et al.*, 2006).

La plupart des fromages sont inoculés avec des ferments lactiques pour le développement de la production et de la saveur acide. La recette du fromage inclut parfois des cultures secondaires et auxiliaires, ainsi. Les Ferments primaires utilisés dans les produits laitiers fermentés sont principalement des bactéries lactiques (BL) et les espèces communs impliqués incluent *L. lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *S. thermophilus* et *Lactobacillus*

*delbreckii*, mais pas tous d'entre eux sont utilisés dans toutes sortes de fromage. Les BL sont des bactéries à Gram-positif, qui utilisent le lactose et génèrent de l'acide lactique au cours de la fermentation. En outre, Les enzymes protéolytiques et lipolytiques dans les BL génèrent des composés gustatifs dans ce processus. En plus de ferments primaires, certaines BL sont également utilisées comme cultures auxiliaires dans la fermentation du fromage. Les cultures complémentaires améliorent encore la production de composés gustatifs. Les BL utilisées comme cultures auxiliaires sont appelées bactéries lactiques non-initiales (NSLAB). Les probiotiques, y compris certaines BL, tels que les espèces de *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* et *Escherichia coli*, qui sont bénéfiques pour la santé humaine (Wang *et al.*, 2006 ) sont également utilisés comme cultures de départ ou cultures adjuvantes dans la fermentation laitière.

#### **IV-4-2 Contamination au niveau de la culture initiale**

Pendant la fabrication du fromage, les cultures de démarrage produisent de l'acide lactique qui abaisse le pH et inhibe l'altération et les microorganismes pathogènes. Cela contribue à la sécurité microbienne du fromage. En outre des cultures primaires initiales, des cultures de démarrage secondaires sont également utilisées dans certains fromages. Les cultures de démarrage secondaires sont utilisées dans le processus de maturation et leur inoculation initiale est beaucoup plus faible en concentration que les cultures primaires initiales. Par exemple, les moisissures sont des cultures secondaires dans le fromage bleu et le camembert. Pendant le processus de maturation à haute température en Gruyère, les bactéries propioniques sont introduites comme culture secondaire. Les bactéries propioniques prolifèrent et produisent du dioxyde de carbone, qui forme des ouvertures en gruyère.

Aujourd'hui, de nombreuses cultures initiales sont commercialisées et emballées sous forme condensée ( $10^9$  UFC/ g). Ceux-ci peuvent être directement utilisés pour la fabrication du fromage, en minimisant la contamination potentielle. Cependant, certains fabricants de fromage utilisent également des cultures végétales ou des cultures adjuvantes pour le développement de la saveur. Il est important de maintenir correctement les cultures de départ. Une mauvaise manipulation peut entraîner une contamination bactériophagique, une diminution de l'activité de la culture initiale et une augmentation de la contamination par les agents pathogènes, entraînant des maladies d'origine alimentaire. En outre, la contamination par l'antibiorésistance et la propagation bactérienne résistante aux antibiotiques peuvent également être causées par une maintenance inadéquate des cultures initiales et de la culture

secondaire. La culture initiale contaminée serait un réservoir robuste de l'antibiorésistance s'il était contaminé par des bactéries résistantes aux antibiotiques. Avant 2006, les bactéries et les probiotiques et les bactéries lactiques étaient toujours considérés comme des bactéries bénéfiques et supposés être exempts de gènes de l'antibiorésistance. Par conséquent, le dépistage des gènes de l'antibiorésistance n'a jamais été une pratique courante, même dans les entreprises de culture initiale. Cependant, certaines souches des bactéries lactiques résistantes aux antibiotiques, y compris les probiotiques provenant de produits laitiers fermentés, se sont révélées résistantes à différents antibiotiques (**Daveran-Mignot *et al.*, 1998**).

En outre, les bactéries généralement utilisées comme cultures initiales peuvent être des porteurs de gènes codant pour la résistance (**Wang, *et al.*, 2006**). Ces résultats suggèrent que des conditions environnementales appropriées, des techniques aseptiques rigoureuses et, en particulier, le dépistage de la présence de gènes de l'antibiorésistance et l'implication potentielle dans les événements sont essentiels pour une conservation optimale des ferments lactiques. L'industrie alimentaire, en particulier l'industrie du fromage, doit fournir une réglementation et des directives suffisantes concernant la maintenance de la culture.

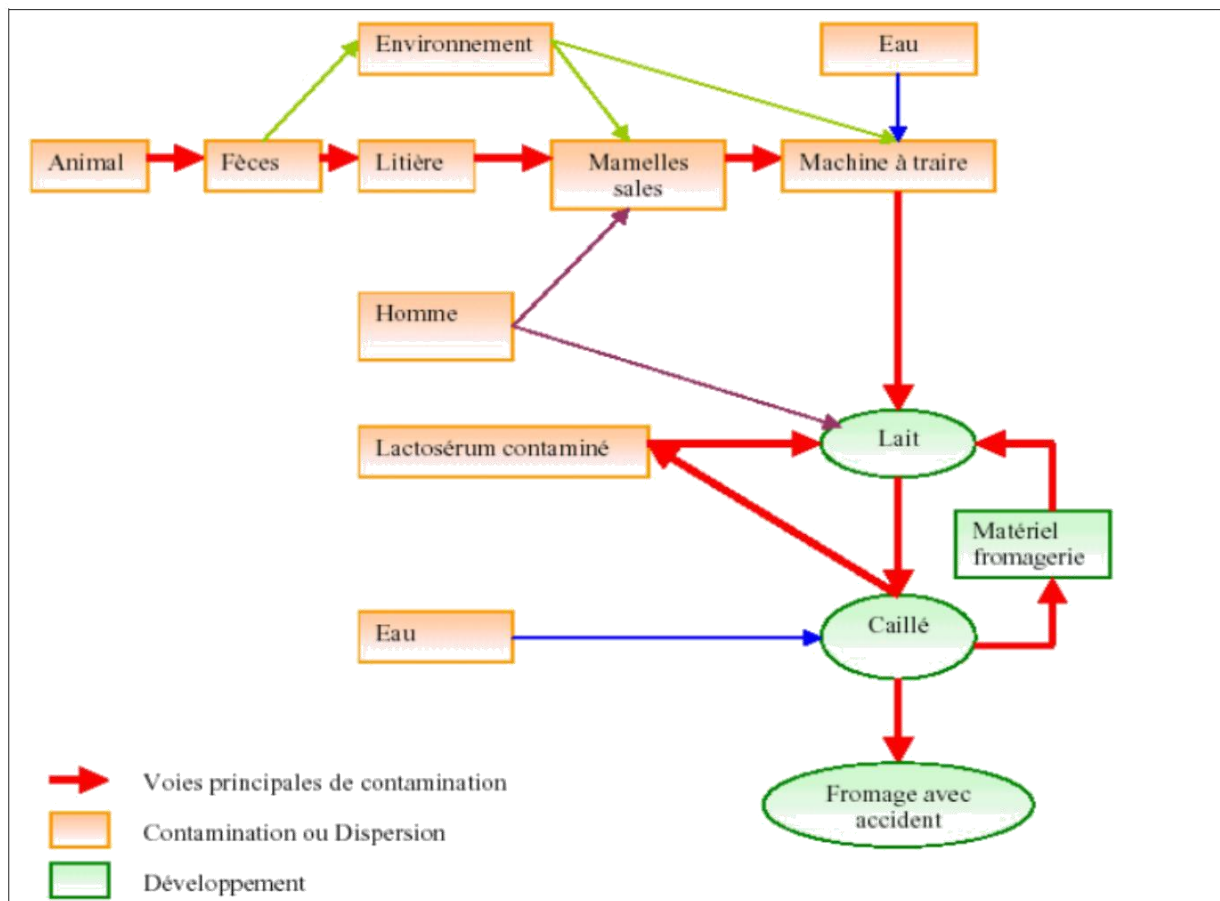
#### **IV-4-3 Contamination au stade de coagulation**

Le premier but de la fabrication du fromage est de transformer le lait liquide en caillé. Ceci est obtenu en ajoutant la présure enzymatique, qui comprend l'enzyme active chymosine, avec la principale fonction de coagulation du lait. La présure a une activité plus élevée dans des conditions acides; Par conséquent, il est généralement ajouté après que les cultures de départ ont fermenté le lait pendant une période de temps (**Helmark *et al.*, 2004**). Même après l'ajout de présure, les cultures initiales prolifèrent et le pH continue de baisser. Après la coagulation, le lactosérum est expulsé et le caillé reste. Le principe majeur de la fabrication du fromage est d'éliminer l'eau du lait. La réduction de la teneur en eau réduit le risque d'altération et de microorganismes indésirables. Le caillé a un pH allant de 4,5 à 5,3 de sorte que les bactéries sensibles aux acides sont expédiées (**Mathur et Singh, 2005**). La façon dont le caillé est traité ultérieurement dépend de quel type de fromage est fait. Le sel sera ajouté, soit en le mélangeant directement au caillé, comme le fromage cheddar, soit en soignant le caillé dans une solution salée saturée, comme dans le gruyère. Les produits fromagers peuvent contenir 0,7-6,0% de sel (**Gasson, 1990**), qui fournit de l'arôme, contrôle la croissance microbienne, limite l'activité enzymatique, réduit encore la teneur en eau et influence la texture du fromage (**Wang *et al.*, 2006**).

#### **IV-4-4 Contamination au stade de l'affinage**

L'affinage est la dernière étape dans la plupart des fromages, à l'exception des fromages frais. On l'appelle aussi vieillissement ou durcissement. Pendant la maturation, les cultures primaires commencent à ralentir, mais tout en fournissant un développement de saveur. Les cultures secondaires, qui sont secondaires pendant les étapes initiales de la fabrication du fromage, prédominent lors de l'étape de maturation. Les cultures secondaires contribuent au développement de la saveur et de la texture des fromages au cours de cette étape. Dans certains cas, les cultures secondaires ne sont pas des souches définies qui sont introduites à partir de sources non contrôlées, telles que le lait ou les cultures adjuvantes. Comme ils n'ont pas été sélectionnés en ce qui concerne l'antibiorésistance et peu de fond est connu, ils peuvent être une source de bactéries résistantes aux antibiotiques dans le fromage. Les enzymes microbiennes, telles que les protéases et les lipases, sont la clé du développement de composés gustatifs dans le fromage.

L'affinage est généralement un processus à basse température, ralentissant les changements chimiques et microbiologiques au cours de cette étape. L'affinage peut durer plusieurs mois ou plusieurs années, afin de produire différents types de fromage. L'affinage contribue également à la sécurité des produits fromagers. Aux États-Unis, il est légal d'utiliser du lait cru pour fabriquer du fromage et le classer comme fromage non pasteurisé. Cependant, les fromages non pasteurisés doivent être affinés pendant au moins 60 jours avant leur mise sur le marché. L'idée étant que c'est pendant le processus de maturation, le fromage devient plus acide, limitant les pathogènes potentiels. Cependant, l'impact de la maturation sur les microbes non pathogènes résistants aux antibiotiques n'a pas été prise en considération.



**Figure N°15** :Voies principales de contamination de fromage par des microorganismes résistants aux antibiotiques (Helmark *et al.*, 2004)

## IV-5 Utilisation des ferments lactiques résistants aux antibiotiques dans la fabrication de fromage

### IV-5-1 Définition des ferments lactiques

Un ferment est une préparation microbienne d'un grand nombre de cellules, d'un seul microorganisme ou plus, ajoutée à une matière première pour produire un aliment fermenté en accélérant et en orientant son procédé de fermentation. Le groupe des bactéries lactiques occupe un rôle important dans ces processus et une longue histoire d'application. Actuellement, on définit les levains ou ferments lactiques comme étant des cultures pures ou des mélanges de bactéries lactiques sélectionnées et utilisées pour la fabrication de produits fermentés comme les yaourts, le kéfir et les fromages. (Mathur et Singh, 2005).

## IV-5-2 Types de ferments lactiques

Les ferments lactiques peuvent être classés en se basant sur leur fonction, leur température de croissance, ou leur composition

### IV-5-2-1 Selon la composition

Selon la fédération internationale de laiterie (1997), les ferments lactiques peuvent être classés en trois catégories (Mathur et Singh, 2005) :

- **Ferments purs** : constitués d'une souche d'une seule espèce bien caractérisée, c'est-à-dire une culture provenant en principe d'une seule cellule bactérienne.
- **Ferments mixtes** : ils sont formés d'un mélange de souches en nombre et en proportions indéfinis, ces souches appartiennent aux différents types lysotypiques et ont donc, en général, une bonne activité acidifiante.
- **Ferments mixtes sélectionnés** : contiennent plusieurs souches bien définies, issues d'une ou de plusieurs espèces et les proportions entre les souches sont connues et définies selon le cahier des charges de l'utilisateur.

### IV-5-2-2 Selon la température de croissance

Les ferments lactiques sont, selon les productions industrielles à réaliser, des ferments mésophiles et des ferments thermophiles :

#### a) Ferments mésophiles

Les bactéries lactiques qui constituent ces ferments ont une température optimale de croissance qui varie selon les souches entre 25°C et 30°C et peuvent atteindre une température maximale de fermentation de 38°C à 40°C. Ils sont constitués essentiellement des espèces acidifiantes (*Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lc. lactis ssp. cremoris*) et des espèces aromatisantes (*Lc. lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*). Les ferments mésophiles sont habituellement utilisés dans la fabrication de plusieurs variétés de fromages, en particulier les fromages frais, de certains laits fermentés et du beurre (Ammor *et al.*, 2007).

#### b) Ferments thermophiles

Ils comprennent les lactobacilles, les bifidobactéries et l'espèce *Streptococcus thermophilus*. Leur température optimale de croissance se situe entre 40°C et 50°C. Les ferments thermophiles sont souvent utilisés pour la fabrication des yaourts, certains laits fermentés et quelques fromages à pâte cuite tels que l'Emmental et le Gruyère (Ammor *et al.*, 2007).



**Tableau N°08 : Bactéries lactiques principales utilisés en technologie fromagère (coan et al,1991)**

| Type de levains                     | Nom  | Produits               |
|-------------------------------------|--|------------------------|
| <b>Mésophiles</b>                   |  |                        |
| <b>O</b>                            | <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>        | Fromages frais,cheddar |
|                                     | <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>          | Mimolette,feta         |
| <b>L</b><br><b>Ou</b><br><b>B</b>   | <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>        | Pates molles           |
|                                     | <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>          | Pate pressés           |
| <b>Ld</b><br><b>Ou</b><br><b>Bd</b> | <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>        | Pates molles           |
|                                     | <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>          | Pates pressés          |
| <b>Thermophiles</b>                 |  |                        |
|                                     | <i>Lactobacillus delbruckii</i> ssp <i>bulgarius</i> | Mozzarella             |
|                                     | <i>Lactobacillus helveticus</i>                      | Emmental               |

O :homofermontaires acidifiants stricts

B ou l :culture acidifiantes avec leuconostoc

D :cultures acidifiantes avec diacetylactis

#### **IV-5-3 Profils de résistance aux antibiotiques des bactéries lactiques**

La caractérisation des souches de bactéries lactiques comme étant résistantes ou sensibles aux antibiotiques est généralement réalisée à l'aide de méthodes phénotypiques. Cela reste un peu délicat car des facteurs comme la taille de l'inoculum et le temps d'incubation peuvent influencer les résultats . Différentes méthodes d'essai ont été utilisées comme la détermination de CMI dans un milieu liquide, notamment par microdilution (**Kushiro et al., 2009**), E-test , diffusion de dilution en gélose et disques d'antibiotiques (**Gevers et al., 2000**).

Les profils de résistance aux antibiotiques de différentes espèces de bactéries lactiques sont assez différents et "spécifiques" à l'espèce, ils ont été étudiés dans de nombreux pays par différentes méthodes phénotypiques et génotypiques (**Ammor et al., 2007** ). En général la plupart de ces espèces sont résistantes aux inhibiteurs de la synthèse d'acide nucléique comme

fluoroquinolones, ofloxacine, métronidazole à des CMI supérieur à 32 mg/L. Elles sont aussi résistantes aux sulfonamides ( $\geq 256$  mg/L) et triméthoprime ( $\geq 30$  mg/L) . Elles peuvent aussi présenter des résistances intrinsèques à l'acide folique (**Katla et al., 2001**).

Les espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* sont résistantes à des concentrations élevées de cefoxitine (céphalosporine de 2ème génération) (CMI $\geq 30$  mg/L) (**Florez et al., 2005**), mais les souches de *Bifidobacterium* y sont très sensibles. Certaines souches de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* sont résistantes à quelques d'inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane comme la vancomycine (CMI $\geq 256$  mg/L), et la plupart des lactocoques y sont très susceptibles (CMI  $\leq 2$  mg/L) ( **Florez et al., 2005**). Les souches de *Bifidobacterium* affichent une résistance intermédiaire à cet antibiotique (**Kushiro et al., 2009**).

D'autres études ont signalé que les bactéries lactiques ont une très grande sensibilité à la piperacilline et tazobactame (beta-lactamines), certaines souches étant intermédiaires (CMI  $\leq 16$  mg/L) (**Florez et al., 2005**). Dans ces mêmes études les auteurs soulignent l'importance d'identifier les CMI spécifiques pour chaque espèce, ce qui permet de différencier les souches vecteurs des gènes de résistance aux antibiotiques.

La commission européenne de sécurité alimentaire (**Commission Européenne 2008**) a mis à jour les concentrations minimales inhibitrices microbiologiques qui catégorisent les bactéries lactiques soit comme résistantes ou sensibles (**Tableau 09**).

D'autre part, on doit garder à l'esprit qu'il existe des mécanismes de résistances encore inconnus qui pourraient également être responsables de la CMI accrue de ces souches.

**Tableau N°09:** Concentrations minimales inhibitrices pour la sélection des bactéries lactiques (Commission Européenne 2008).

| Souches/ATB                    | AMP | VAN | GEN | KAN | STR | ERY | CLI | Q+D | TET | CHL |
|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>Lb. Homofermentaires</i>    | 1   | 2   | 16  | 16  | 16  | 1   | 1   | 4   | 4   | 4   |
| <i>Lb. Helveticus</i>          | 1   | 2   | 16  | 16  | 16  | 1   | 1   | 4   | 4   | 4   |
| <i>Lb. acidoph./delb</i>       | 1   | 2   | 16  | 16  | 16  | 1   | 1   | 4   | 4   | 4   |
| <i>Lb. heterofermentaires</i>  | 2   | Nd  | 16  | 16  | 64  | 1   | 1   | 4   | 8   | 4   |
| <i>Lb. Reuteri</i>             | 2   | Nd  | 8   | 16  | 64  | 1   | 1   | 4   | 16  | 4   |
| <i>Lb. Fermentum</i>           | 1   | Nd  | 16  | 32  | 64  | 1   | 1   | 4   | 8   | 4   |
| <i>Lb. facult. heteroferm.</i> | 4   | Nd  | 16  | 64  | 64  | 1   | 1   | 4   | 8   | 4   |
| <i>Lb. Plantarum</i>           | 2   | Nd  | 16  | 64  | Nd  | 1   | 1   | 4   | 32  | 8   |
| <i>Lb. Rhamnosus</i>           | 4   | Nd  | 16  | 64  | 32  | 1   | 1   | 4   | 8   | 4   |
| <i>Lb. Paracasei</i>           | 2   | Nd  | 32  | 64  | Nd  | 1   | 1   | 4   | 4   | 4   |
| <i>Enterococcus</i>            | 4   | 4   | 32  | 512 | 128 | 4   | 4   | 4   | 8   | 8   |
| <i>Pediococcus</i>             | 4   | Nd  | 16  | 64  | 64  | 1   | 1   | 4   | 2   | 4   |
| <i>Leuconostoc</i>             | 2   | Nd  | 16  | 16  | 64  | 1   | 1   | 4   | 8   | 4   |
| <i>Lc. Lactis</i>              | 2   | 4   | 32  | 64  | 64  | 2   | 4   | 4   | 8   | 8   |

AMP: ampicilline; VAN: vancomycine; GEN: gentamicine; KAN: kanamycine; STR: streptomycine; ERY: érythromycine; CLI: clindamycine; Q+D: quinupristine+dalfopristine; TET: tétracycline; LCH: chloramphénicol; n.d: non déterminé.

#### IV-5-3-1 *Lactobacillus*

Les Lactobacilles sont généralement susceptibles aux antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines, telles que le chloramphénicol, l'érythromycine, la clindamycine, mais sont habituellement résistants à la plupart des inhibiteurs de la synthèse d'acide nucléique, pefloxacin, norfloxacin, acide nalidixique, sulphaméthoxazole, triméthoprime, cotrimoxazole et métronidazole fluoroquinolones (Gasson et Shearman, 2003).

Ces bactéries ont aussi des résistances intrinsèques aux aminoglycosides (néomycine, kanamycine, streptomycine et gentamicine), glycopeptides, vancomycine et teicoplanines. La résistance intrinsèque à la tétracycline et l'érythromycine est rarement trouvée chez les Lactobacilles, leurs présences ont toujours été associées à la présence des gènes *tetM*, *tetW* et/ou des gènes *ermB*. (Ammor et al., 2007 ; Florez et al., 2005).

En ce qui concerne les inhibiteurs de synthèse de la paroi cellulaire, les Lactobacilles sont habituellement sensibles aux pénicillines (piperacilline et ampicilline) et aux inhibiteurs de béta-lactamase, mais résistantes à l'oxacilline et aux céphalosporines (cefoxitine et ceftriaxone) ( **Ammor et al., 2007** ). la susceptibilité à la bacitracine varie considérablement entre les souches de Lactobacilles (**Katla et al., 2001**).

Le problème de l'acquisition des gènes de résistances aux antibiotiques a été également identifié chez plusieurs souches de Lactobacilles ( **Florez et al., 2005** ). Ainsi, des gènes de résistance au chloramphénicol ont été retrouvés chez *Lb. reuteri* et *Lb. Plantarum* , et d'autres gènes de résistance aux macrolides, essentiellement l'érythromycine, ont été identifiés dans beaucoup d'espèces de Lactobacilles tels que *Lb. amylovorus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. brevis* . La résistance acquise à la tétracycline est considérée comme l'un des phénomènes les plus connus chez les souches de Lactobacilles : plusieurs gènes de résistance comme *tet*(K, M, O, Q, S, W, 36) ont été identifiés chez *Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. crispatus* et *Lb. johnsonii* .Mais les gènes les plus répandus chez ce groupe de bactéries lactiques sont les gènes *tetW* et *tetM*, et le gène *tetS*, ce dernier est porté par un ADN plasmidique chez *Lb. plantarum* (**Gfeller et al.,2003**).

#### **IV-5-3-2 Lactococcus**

Les premières études indiquaient que les souches de Lactocoques avaient une sensibilité à la plupart des agents antimicrobiens à l'exception des résistances intrinsèques à la rifampicine, metronidazole, cefoxitine et triméthoprime, (**Gevers et al., 2000**). Ces souches ont aussi des résistances naturelles aux antibiotiques à large spectre sur les bactéries à Gram négatif (acide fusidique, acide nalidixique et polymyxine B) et aux aminoglycosides (amikacine, gentamicine et kanamycine) (**Florez et al., 2005**).

*Lc. lactis* est habituellement susceptible aux antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram positif comme les antibiotiques de la famille des macrolides et à d'autres antibiotiques comme bacitracine, érythromycine, lincomycine, novobiocine, teicoplanine et vancomycine. Cette espèce est aussi sensible aux antibiotiques à large-spectre (pectinomycine et chloramphénicol) et aux béta-lactames (pénicilline, ampicilline, amoxicilline, piperacilline, ticarcilline et imipenem) (**Ammor et al., 2007**). En plus cette souche est très susceptible aux inhibiteurs de la synthèse protéique comme la tétracycline (**Kushiro et al., 2009 ; Ammor et al., 2007**), cependant la susceptibilité à la céphalothine, nitrofurantoïne et à cefotétane est variable.

Des isolats de *Lc. lactis* résistantes aux antibiotiques chloramphénicol, érythromycine, streptomycine et tétracycline ont été identifiés : l'acquisition de ces nouveaux gènes de résistances a été attribuée à un transfert horizontal du plasmide pK214 originaire de *Lc. lactis*. *ssp lactis* K214 isolée d'un fromage à pâte molle au lait cru (**Gfeller et al.,2003**).

#### **IV-5-3-3 *Streptococcus thermophilus***

*St. thermophilus* est habituellement sensible au chloramphénicol, tétracycline, érythromycine, cephalothine quinupristine/dalfopristine et ciprofloxacine. En plus cette souche est très sensible aux inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane comme la pénicilline G, l'ampicilline et la vancomycine. En revanche elle est très résistante aux aminoglycosides (gentamicine, kanamycine, and streptomycine), et à la triméthoprimine et sulphadiazine (**Katla et al., 2001**).

#### **IV-5-3-4 *Leuconostoc***

En plus de leur résistance naturelle aux glycopeptides, cefoxitine et metronidazole, les *Leuconostoc*s sont habituellement résistants à l'acide nalidixique, gentamicine, kanamycine, streptomycine, nitrofurantoinne, sulfadiazine, triméthoprimine et vancomycine ( **Katla et al., 2001; Florez et al., 2005**).

La plupart des souches de *Leuconostoc* sont susceptibles aux antibiotiques rifampicine, chloramphénicol, érythromycine, clindamycine et tétracycline ( **Florez et al., 2005**).

La résistance acquise à l'érythromycine et au chloramphénicol observées chez quelques espèces de *Leuconostoc* comme *Leuconostoc dextranicum* et *Leuconostoc cremoris* est due au plasmide pIP501, originaire de *St. agalactiae*, qui peut être transféré par conjugaison (**Daveran-Mignot et al., 1998**).

### **IV-6 Causes possibles pour la résistance aux antibiotiques dans le fromage**

on peut résumer toute les causes dans les points suivants :

- L'utilisation des antibiotiques dans l'élevage
- la présence des résidus d'antibiotique dans le lait
- l'absence d'une control de qualité efficace vis-à-vis a les contamination du lait et du fromage par des microorganismes résistantes aux antibiotiques au niveau des usines de transformation

- L'utilisation des microorganismes résistantes aux antibiotiques dans la fabrication des fromages principalement les ferments lactiques

#### **IV-7 Conséquences possibles de la résistance aux antibiotiques dans le fromage et les denrées alimentaires (Gevers *et al.*, 2000)**

Les conséquences possibles d'une antibiorésistance accrue des bactéries d'origine alimentaire pourraient être les suivantes :

- Un taux de morbidité accru
- Un taux de mortalité accru
- Un nombre croissant de traitements sans succès et de cas pour lesquels il n'existe aucun traitement électif
- Baisse de productivité imputable à l'incapacité des patients à travailler
- Frais hospitaliers
- Coûts croissants des médicaments et autres dépenses relatives aux traitements
- Coûts croissants au sein de l'industrie de l'alimentation

#### **IV-8 Prévention contre la contamination de fromage par des microorganismes qui peuvent être résistants aux antibiotiques**

##### **IV-8-1 Guide des bonnes pratiques d'hygiène**

###### **a- Personnel**

Quelques règles d'hygiène doivent impérativement être respectées sur les lieux de travail :

- Port d'une tenue propre et adaptée empêchant les contaminants fixés sur les vêtements d'entrer en contact avec les fromages.
- Hygiène personnelle correcte : cela passe par le lavage des mains obligatoire avant chaque reprise du travail (après les pauses, les repas, les toilettes...) ou après toute manipulation contaminante.
- Hygiène du comportement : interdiction de fumer, de manger, de cracher dans les locaux de travail.

## **b- Locaux et matériel**

- Nettoyage : La maîtrise du nettoyage est primordiale pour diminuer les sources de contamination des produits alimentaires. Son but est de supprimer toutes les souillures en appliquant un détergent par action mécanique. Quatre principaux paramètres sont à maîtriser : (**De Buysser,2001**)
- Le temps d'action qui correspond à la durée de contact entre le détergent et la salissure pour que le nettoyage soit efficace
- L'action mécanique : brossage, frottement, jet d'eau, ou vapeur d'eau sous pression.
- La température, qui augmente la vitesse des réactions chimiques
- La concentration du produit pour une efficacité maximale.
- Désinfection : elle a pour objet de détruire les microorganismes nuisibles et ne peut avoir lieu que sur une surface parfaitement nettoyée. Son efficacité dépend de la concentration du produit utilisé, du temps de contact, de la température, du pH et du type de microorganismes.

### **IV-8-2 Méthode HACCP**

Le système HACCP, ou l'analyse des dangers et maîtrise des points critiques, est un outil méthodologique indispensable pour la maîtrise de la sécurité sanitaire alimentaire. Alors que les programmes d'assurance qualité classiques se focalisent sur des problèmes identifiés au niveau du produit fini, la méthode HACCP est une technique proactive qui identifie les problèmes potentiels et les contrôles durant tout le processus de fabrication, depuis les matières premières jusqu'au consommateur. Les aliments qui ne sont pas produits conformément au système HACCP, ne peuvent pas être vendus sur le marché. Les autorités sanitaires sont chargées de vérifier que ce système est bien appliqué. (**De Buysser,2001**)

### **IV-8-3 Chaîne du froid**

La température des denrées alimentaires est un des paramètres clé pour une alimentation saine. Dans des conditions optimales de température et de composition du milieu, une bactérie peut donner naissance à des millions de bactéries en une journée. Or les technologies du froid permettent de ralentir ou inhibent totalement la croissance microbienne dans les fromages sans en altérer les qualités organoleptiques et nutritionnelles. (**De Buysser,2001**)

#### **IV-8-4 Contrôle des cheptels**

La prophylaxie de toutes types de la contamination de fromage par des microorganismes résistantes aux antibiotiques commence bien évidemment par le premier maillon de la chaîne : l'animal

De nombreux points sont à contrôler :

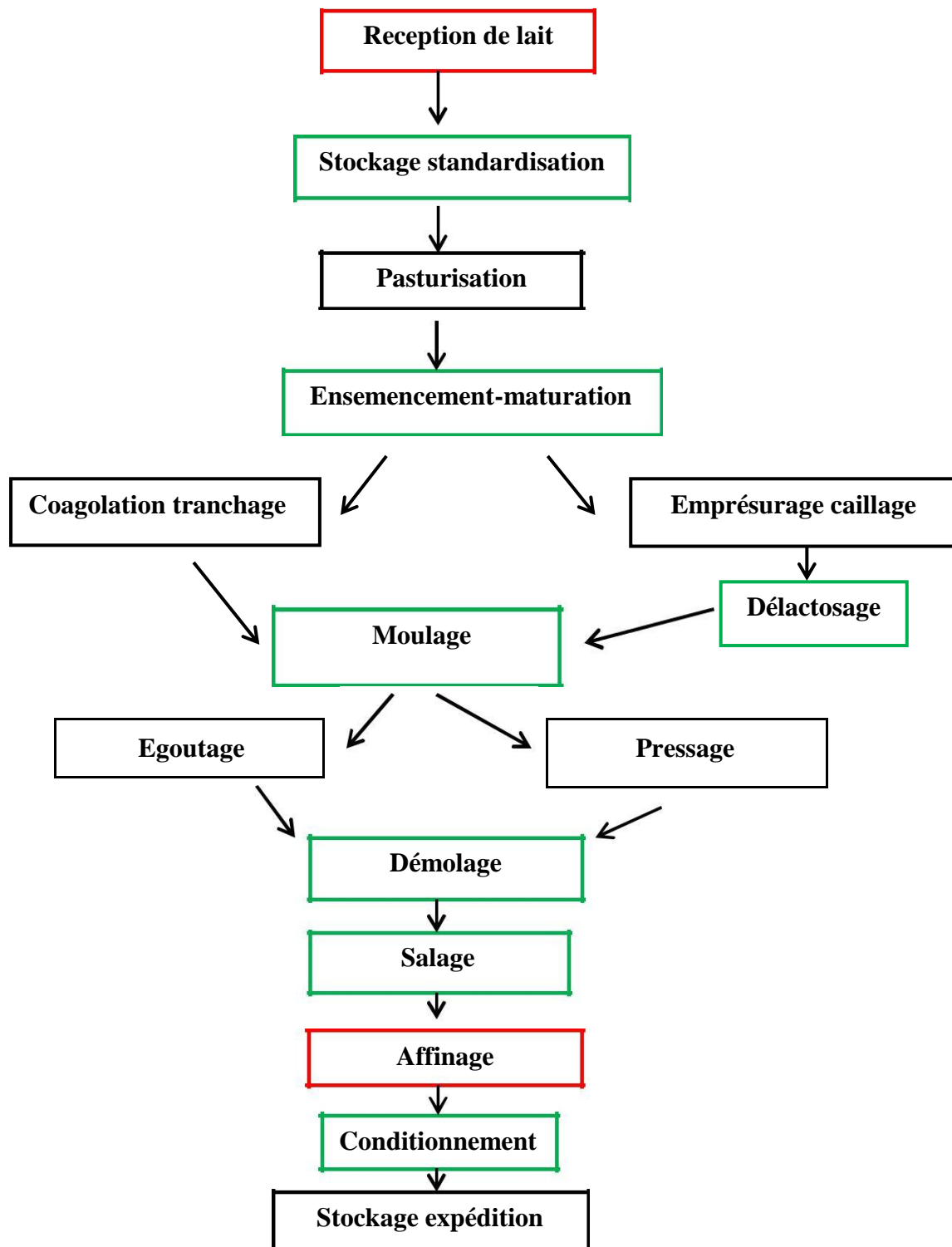
- Garantie d'une utilisation appropriée des antibiotiques chez les animaux ;
- L'interdiction d'utilisation d'antibiotiques comme promoteurs de croissance ;
- Le contrôle de L'alimentation et de l'eau ;
- L'hygiène est capitale. En effet, un animal infecté peut très rapidement transmettre la bactérie à tout le troupeau via ses fécès. (**Wang *et al.*, 2006**)

#### **IV-8-5 Contrôles sur la chaîne de production**

Sur la chaîne de fabrication des fromages, plusieurs stades présentent un risque non négligeable de contamination ( **De Buysser,2001**)

- La pasturation limite le risque de transmission des microorganismes
- La sélection des ferments et leur bonne qualité et dosage
- La désinfection du matériel et l'hygiène personnel en cas d'intervention manuelle
- L'égouttage doivent passe dans des salles conditionnées en température et hygrométrie
- L'évaluation de la qualité microbiologique de la saumure ou du sel sec et du taux de sel.
- Contrôler l'hygiène de l'opération du conditionnement





Stade présentant un risque mineur de contamination  
 Stade présentant un risque majeur de contamination

**Figure 16 :** Diagramme de fabrication, points critiques pour la maîtrise ( De Buysser,2001)

# ***Conclusion***

## Conclusion

La chaîne alimentaire joue un rôle important dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques dans l'écosystème. Par conséquent, le contrôle de l'antibiorésistance dans les produits fromagers n'est pas seulement essentiel pour l'industrie laitière, mais aussi pour la santé publique. Dans cette étude, une évaluation des différents facteurs potentiels contribuant à l'antibiorésistance dans les produits fromagers a été menée. Comme prévu, la pasteurisation a permis de réduire avec succès les bactéries résistantes aux antibiotiques du lait cru.

L'antibiorésistance peut être efficacement réduite avec des contrôles d'assainissement et de traitement appropriés. La culture maintenue par l'usine était encore une source potentielle de contamination bactérienne de résistante aux antibiotiques, ce qui suggère que de meilleures pratiques d'entretien de la culture sont essentielles et nécessaires dans l'industrie du fromage. Une production rapide et suffisante d'acide à partir de la croissance des ferments lactiques a joué un rôle important dans l'inhibition de la prolifération des bactéries résistantes aux antibiotiques. Une étude de surveillance à petite échelle à partir de 2010 a révélé que la prévalence de l'antibiorésistance dans les échantillons de fromage au détail a chuté par rapport aux données de 2006, ce qui suggère l'efficacité de l'atténuation de la résistance aux antibiotiques ciblée dans les produits connexes. Par conséquent, les préventions identifiées dans cette étude peuvent être pratiquement appliquées dans l'industrie du fromage pour minimiser la contamination par l'antibiorésistance

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie. La résistance naturelle est un caractère généralement présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance a été détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique afin de déterminer son activité et contribue à définir son spectre antibactérien. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible, cependant la résistance acquise implique des changements génétiques chromosomiques par mutation ou extra-chromosomique après transfert horizontal des éléments génétiques mobiles.

La fabrication du fromage est un processus compliqué avec différents équipements, étapes et autres facteurs environnementaux impliqués. La contamination sporadique par l'antibiorésistance peut encore se produire pendant la fabrication du fromage. Il est également important de comprendre les caractéristiques liées à la diffusion de l'antibiorésistance et à la persistance des isolats résistants aux antibiotiques à partir de l'environnement du fromage. Dans cette étude, on a déterminé les voies d'acquisition et de

diffusion de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries lactiques et les voies possibles de contamination du fromage par les bactéries résistantes aux antibiotiques.

***Références  
bibliographiques***

## A

- 1-Abidi K. (2004).,Residus d'antibiotiques dans le lait de boisson, medecine veterinaire ecole nationale de médecine vétérinaire de sidi thabet, tunisie, p. 6-23
- 2- Alais C. (1984). Sciences du lait. Principes de techniques laitières. 3éme édition, édition publicité france.
- 3- Alais C. (1975). Sciences du lait. Principes des techniques laitières. Edition sepaic, paris
- 4- Ammor, m.s., flórez, a.b., mayo, b., (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid Bacteria and bifidobacteria. Food microbiol. 24, 559-570.
- 5-Arias, C. A., and B. E. Murray. 2009. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century-a clinical super-challenge. N. Engl. J. Med. 360:439-443.

## B

- 6- Bates, J., Jordens, Z.J, Griffiths, D.T., (1994). Farm animals as a putative reservoir for vancomycinresistant enterococcal infection in man. J. Antimicrob chemother. 34, 507-516.
- 7- Benlmouden, A., et Hakkou, F (2007). Antibiotiques : mécanismes d'action et de Résistance. Service de pharmacologie, faculté de médecine et de pharmacie, casablanca, maroc.la chronique ibn rochd. 1: 46-54.
- 8- Benveniste, R., and J. Davies. (1973). Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa. 70:2276-2280.
- 9- Boultif I. (2009).,Optimisation des parametres de detection et de quantification des residus d'antibiotiques dans le lait par chromatographie liquide haute performance (hplc) - enseignements pour l'algerie.these de magister en medecine veterinaire. Universite de constantine.
- 10- Buddhiman, t., jyoti, p.t., ulrich, s., charles, m.a.p.f., michael, g., wilhelm, h.h. (2008). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented Bamboo tender shoots of north east india. International journal of food microbiology. 121(1), 35-40.
- 11- Brule G., Lenoir G. Et Ramet F., (1997). Les mécanismes généraux de la Transformation du lait en fromage chapitre 1 : la micelle de caséine et la coagulation du Lait. Dans le fromage (coord. Eck a. Et gillis j.c.) P. 7, 3ème ed. Tec et doc. Lavoisier

## C

- 12- Carattoli, A. (2001).Importance of integrons in the diffusion of resistance.veterinary. Research.32: 243-259.
- 13- Cattoir, V. (2006). Chloramphenicol, fosfomycine, acide fusidique et polymyxines. Chapitre in antibiogramme. 2 ed. Paris. Eska , p. 359-363.
- 14- Cavallo, J.D., Fabre, R., Jehl, F., rapp, c., and garrabé, e., (2004). Bêtalactamines. Emc Maladies infectieuses. 1: 129-202.

- 15- Cerniglia C.E., Kotarski S. Approaches in the safety evaluations of veterinary antimicrobial agents in food to determine the effects on the human intestinal microflora journal of veterinary pharmacology and therapeutics, 2005, 28, (1), p3-20
- 16- Chataigner B., Stevens A. (2005).,Investigation sur la presence de residus d'antibiotiques dans les viandes commercialisees a dakar.,institut pasteur de dakar, p. 6-9.
- 17- Chengappa, M.M., (1990). Antimicrobial agents and susceptibility testing, in diagnostic Procedures in veterinary bacteriology and mycology, academic press. P. 479- 492.
- 18- Changeur, N., Cherruault, M. (2009). Pharmacologie des aminosides(aminoglycosides). 3p.
- 19- Chopra, i.(1998). Research and developpement of antibacterial agents. Current opinion in Microbiology. 1:495-501.
- 20- Charlier, p., et al. (1998). Résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines. Synthèse.médecine/sciences. 14 : 544-555.
- 21- Chauvin C., Madec F., Le Bouquin S., Sanders P. (2002),Analyse pharmaco-épidémiologique de l'utilisationDes antibiotiques. Relation avec la résistance aux antibiotiques bull. Acad. Vét. De france, , 155, p277-282
- 22- Claycamp, H.G., and Hooberman, B.H., (2004). Antimicrobial resistance risk assessment in foodSafety. J food prot. 67, 2063-2071.
- 23- Courvalin, P., Drugeon ,H., Flandrois ,J.P., Goldstein, F., (1991). Bactericidie: aspect Théoriques et thérapeutiques ; édition maloine. Pages, 13, 14, 23, 26.

## D

- 24- Danevan-mingot, M.L., Campo, N., Ritzenthaler, P., and Le Bougeois, P., (1998). A natural large Chromosome inversion in lactococcus lactis is mediated by homologous recombination between Two insertion sequences. J. Bacteriol. 180, 4834-4842.
- 25- Davison, J. (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. Plasmid. 42, 73-91.
- 26- Dbaibo, G.S. (2000). Old and new targets of antibacterial therapy. Leb med j. 48: 177-181. 3-
- 27- Devirgiliis, C., S. Barile, A. Caravelli, D. Coppola, and G. Perozzi. 2010. Identification of tetracycline- and erythromycin-resistant gram-positive cocci within the fermenting microflora of an italian dairy food product. J. Appl. Microbiol. 109: 313-323
- 28- Dibner, J.J., and Richards, J.D., (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and Mode of action. Poult sci. 84, 634-643.

## E

- 29- Emmanuel, E. (2003). Evaluation des risques sanitaires et ecotoxicologiques lies aux Effluents hospitaliers. L'institut national des sciences appliquées de lyon pour l'obtenir de Grade du docteur. Formation doctorale: science et technique du déchet école doctoral de chimie De lyon.pp. 59-60.

30- Enright, M.C. And Spratt, B.G. (1999). Multilocus sequence typing. Trends microbiol. 7, 482-487

## **F**

31- Fao. (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection fao alimentation et nutrition n°28.

32- Fauchère, J.L., et Avril, J.L. (2002). Bactériologie générale et médicale. Ellipses edition Marketing. Paris. Pp. 250-260.

33- Ferech, M., and Coenen, S. (2006). "European surveillance of antimicrobial consumption (esac): outpatient antibiotic use in europe". J antimicrob chemother. 58(2): 401-407.

34- Flandrois, J.C., Courco, L., Lemeland, J.F., Ramuc, M., Sirot, J. Et Souny, C.J. (1997). Bactériologie médicale. Pesses universitaire de Lyon. Isbn : 2729705678.

35- Florez, a. B., s. Delgado, and B. Mayo. (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. Can. J. Microbiol. 51:51-58.

36- Fox P.F., Snigh TR. And Sweney M.C., (1994). Proteolysis in cheese during Ripening. In : biochemistry of milk products. (ed. Fox p.f.) P. 1-31, the royal society of Chemistry.

## **G**

37- Gasson, M. (1990). In vivo genetic systems in lactic acid bacteria. Fems microbiol. Rev. 87, 43-60

38- Gasson, M.J., Shearman, C.A. (2003): Plasmid biology, conjugation and transposition, in: genetics Of lactic acid bacteria, eds. Wood, b.j.b. And warner, p.j., kluwer academic/plenum publishers, New york, ny, 25-44.

39- George , G., Khachatourians, B.A. (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and Transfer of antibiotic-resistant bacteria. Canadian medical association., ;159, 1129-1136

40- Gerard, I et al. (2003). Introduction à la microbiologie, pp.608-612.

41- Gevers, D, Masco, L., Baert, L., Huys, G., Debevere, J., Swings, J., (2003b). Prevalence and diversity Of tetracycline resistant lactic acid bacteria and their tet genes along the process line of fermented Dry sausages. Systematic and applied microbiology. 26 (2), 277-283

42- Gfeller, K.Y., Roth, M., Meile, L., Teuber, M. (2003). Sequence and genetic organization of the 19.3-Kb erythromycin- and dalfopristin-resistance plasmid plme300 from lactobacillus fermentum Rot1. Plasmid. 50, 190-201.

43- Gogny, M et al. (2001). Classification des principes actif. L'arsenal thérapeutique Vétérinaire. Edition le point vétérinaire. P. 165-168.

44- Gootz, T.D. (1990). Discovery and development of new antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 3(1): 13-31.

45- Guiraud j.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Edition dunod. Paris. Pp : 136-139.



## H

- 46- Hammad, a. M., Y. Ishida, and T. Shimamoto.( 2009). Prevalence and molecular characterization of ampicillin-resistant enterobacteriaceae isolated from traditional egyptian domiati cheese. *J. Food prot.* 72:624-630.
- 47- Havarstein, L.S. (1998). Bacterial gene transfer by natural genetic biotransformation. *Acta Pathologica, microbiologica et immunologica scandinavica.*106, 84-55.
- 48- Helmark, S., Hansen, M.E., Jelle, B., Sorensen, K.i., Jensen, P.R., (2004). Transformation of *Leuconostoc carnosum* 4010 and evidence for natural competence of the organism. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3695-3699.
- 49--Hermann, T. (2005). Drugs targeting the ribosome. *Corrent opinion in microbiologie.* 15, 335-366.

## J

- 50- Jepsen A. (1962).,Les residus de desinfectants et d'antibiotiques dans le lait. P 459 à 464.
- 51- Jouy E., Meunier D., Martel J.L., kobisch M., Coudert M., Sanders P. Méthodologie du réseau national de surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les principales bactéries pathogènes des animaux de rente (resapath) *bull. Acad. Vét. De france*, 2002, 155, p259-266

## K

- 52- Katla, A.K., Kruse, H., Johnsen, G., Herikstad, H., (2001). Antimicrobial susceptibility of starter Culture bacteria used in norwegian dairy products. *Int. J. Food microbiol.* 67, 147–152.
- 53- Klein G.(1999) Food as a potential vector for antibiotic resistances. 1. Relevance of residues and selected foodborne pathogens *berliner und munchener tierarztliche wochenschrift*, 112, (10-11), p365-369
- 54- Klein, G., Hallmann, C., Casas, I.A., Abad, J., Louwers, J., Reuter, G., (2000). Exclusion of vana, vanb And vanc type glycopeptide resistance in strains of *lactobacillus reuteri* and *lactobacillus Rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *Journal ofApplied microbiology.* 89 (5), 815-824.
- 55- Kushiro, A., Christian, C., Stephanie, C., Audrey, P., Sophie, L., David , O., Masaharu, O., Ariane, V.,(2009). Antimicrobial susceptibility testing of lactic acid bacteria and bifidobacteria by broth Microdilution method and etest. *International journal of food microbiology.* 132, 54-58

## L

- 56- Larson, E. (2007). Community factors in the development of antibiotic resistance. *Annu. Rev. Public health.* 28:435-447
- 57- Leroy, F ., and de Vuyst, L., (2004). Functional lactic acid bacteria starter cultures for the Food fermentation industry, *trends food sci. Technol.* 15: 67–78.

58- Levy, S.B., Fitzgerald, G.B. And Macone, A.B., (1976). Changes in intestinal flora of farm personnel After introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *N engl j med* 295, 583-588.

59- Leyral G. Et Vierling E. (2007). *Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires*. 4e édition biosciences et techniques. 87p.

60- Livermore, D.M. (1995). "Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance." *Clinmicrobiol rev.* 8(4): 557-584.

61- Li X-Z, et Nikaido, H., (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drug* ; 64:159- 204

## M

62- Matagne, A., Dubus, A., Galleni, M., and Frere, J.M., (1999). The beta-lactamase cycle: a Tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *Nat prod rep.* 16: 1-19.

63- Mathur, S., Singh, R., (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *Int j food Microbiol.* 105(3), 281-295.

64- Mekentichi. (2003). *Qualité physicochimique et bactériologique d'un fromage traditionnel (bouhezza)*.thèse. Département agronomie. Université de batna, algérie.

65- Michaela, S., Reinhard, W., Gerhard, K., Christine, M.E. (2009). Cultivation of anaerobic and Facultatively anaerobic bacteria from spacecraft-associated clean rooms. *Applied and Environmental microbiology.* 11(75), 3484-3491.

66- Michael., John,M., (2007). *Brock : Biologie de microbiologie*.11ed .paris.1047 p.

## N

67- Nanninga, N. (1991). Cell division and peptidoglycan assembly in escherichia coli. *Mol . Microbiol.* 5: 791-795.

68- Nilius, A.M., et Ma, Z., (2002). Ketolides: the future of microlides? *Current opinion in Pharmacology.* 2 : 1-8.

69- Normark, B.H., Normark, S., (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal medicine.* 252, 91–106.

## O

70- O'connor, L., M. O'leary, N. Leonard, M. Godinho, C. O'reilly, L. Coffey, J. Egan, and R. O'mahony. 2010. The characterization of listeria spp. Isolated from food products and the food-processing environment. *Lett. Appl. Microbiol.* 51:490-498.

71- Ogawara, H. (1981).Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria withspecialReference to betalactam antibiotics. *Microbial. Rev.*45(4), 591-619.

72- Ojha, S., and Kostrzynska, M. (2008). Examination of animal and zoonotic pathogens using Microarrays. *Vet res.* 39, 4.

73- Okolo M.I. Bacterial drug resistance in meat animals (1986) : a review international journal of zoonoses, 13, (3), p143-152

## P

74- Pallasch, T.J. (2003). Antibiotic resistance. Dental clinics of north america.47, 623-639.

75- Paul, S. (2005). Bactériologie.6ed.dunod.paris. 515 p.

76- Ploy, M.C., Gassama, A., Chainier, D., et Denis, F., (2005). Les intégrons en tant que Support génétique de résistance aux antibiotiques. Integrons: an antibiotic resistance gene capture system. Immuno-analyse & biologie spécialisée. 20: 343-352.

77- Ponce de Leon-gonzalez l., Wendorff w. L., ingham B. H., Jaeggi J. J. And houck k. B., (2000). Influence of salting procedure on the composition of Muenster-type cheese . J dairy sci 83:1396–1401.

## R

78- Ramet J.P., (1997). La préparation du caillée, 1- : la présure et les enzymes coagulantes Dans le fromage (coord. Eck a. Et gillis j.c.) , 3éme ed. Tec et doc. Lavoisier.p.101-107

79- Rammelsberg, M., Müller, E. & Radler, F., (1990). Caseicin 80: purification and characterization of A new bacteriocin from lactobacillus casei. Archives of microbiology. 154, 249-252.

80- Rizzotti, L., F. La gioia, F. Dellaglio, and S. Torriani. (2009). Characterization of tetracycline-resistant streptococcus thermophilus isolates from italian soft cheeses. Appl. Environ. Microbiol. 75:4224-4229.

81- Rosengren, A., A. Fabricius, B. Guss, S. Sylven, and R. Lindqvist. (2010). Occurrence of foodborne pathogens and characterization of staphylococcus aureus in cheese produced on farm-dairies. Int. J. Food microbiol. 144:263-269.

## S

82- Sanders P., Gicquel M., Humbert F., Perrin-guyomard a., Salvat G. Plan de surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries indicatrices isolées de la flore intestinale des porcs et de la volaille 1999-2001 bull. Acad. Vét. De france, 2002, 155, p267-276

83- Schwarz, F.V., Perreten, V., Teuber, M., (2001). Sequence of the 50-kb conjugative multiresistance Plasmid pre25 from enterococcus faecalis re25. Plasmid. 46, 170-187.

84- Schleifer, K.H., kraus, J., Dvorak, C., kilpper-bälz, R., Collins, M.D. & fischer, w., (1985). Transfer Of streptococcus lactis and related streptococci to the genus lactococcus gen. Nov. Syst appl Microbiol. 6, 183-195.

85- Singer, R.S., Finch, R., wegenger, H.C., Bywater, R., walters, J. And lipsitch, M., (2003) Antibiotic Resistance-the interplay between antibiotic use in animals and human beings. Lancet infect dis. 3, 47-51

86- Smit, G., Smit, B.A., Engels, w.J., (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical Flavour profiling of cheese products. Fems microbiology reviews. 29, 591-610.

87- Stiles, M.E. & holzapfel, w.H., (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int j food microbiol.* 36, 1-29.

## T

88- Tao S.H., Poumeyrol M(1985). Méthodes de détection des antibiotiques dans les viandes par électrophorèse rec. *Méd. Vét.*, 161, (5), p457-463

89- Teuber, M.( 2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:493-499.

90- Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F., (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria From food. *Antonie van leeuwenhoek.* 76, 115-137.

91- Teuber, M., Perreten, V., (2000). Role of milk and meat products as vehicles for antibiotic-resistant Bacteria. *Acta veterinaria scandinavica supplementum.* 93, 111-117.

92- Tunneval, G., & ericson, H., (1954). Sensitivity tests by disc method as a guide for chemotherapy. *Antibiotics and chemotherapy.* 4(8), 886-893.

93- Twiss, E., Coros, A.M., Tavakoli, N.P., Derbyshire, k.M., (2005). Transposition is modulated by a Diverse set of host factors in escherichia coli and is stimulated by nutritional stress, *molecular Microbiology.* 57 (6), 1593-1607.

## V

94- Van den bogaard A.E.(2001). Human health aspects of antibiotic use in food animals : a review *tijdschrift voor diergeneeskunde*, 126, (18), p590-595

95- Van den bogaard, E.e., and Stobberingh, E.E., (1999). Antibiotic usage in animals: impact on Bacterial resistance and public health. *Drugs.* 58, 589-607.

96- Vignola C. (2002). *Science et Technologie du lait transformation du lait.* Edition presses internationales polytechnique, canada. Pp. 3-75.

## W

97- Wang, H. H., M. Manuzon, M. Lehman, k. Wan, H. Luo, T. E. Wittum, A. Yousef, and I. O. Bakaletz.(2006). Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *Fems microbiol. Lett.* 254:226-231.

98- witte, w., (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science.* 279, 996-997.

## Y

99- Yamashita, S.k et al. (2000). Microbiological surveillance and parental antibiotic use in a Critical care unit. *Can j infect dis.* 11, 107-111.

## Z

100- Zeba, B.(2005).Overview of  $\beta$ -lactamase incidence on bacterial drug resistance. *African Journal of biotechnology.*4 (13):15591562.

# *Webographie*

1- [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

2- [www.bioweb.usu.edu](http://www.bioweb.usu.edu)

# *Annexes*

**Annexe 1:** Lait collectes et/ou destinés à la transformation. Règlement (CE) n° 853/2004 du 29 avril

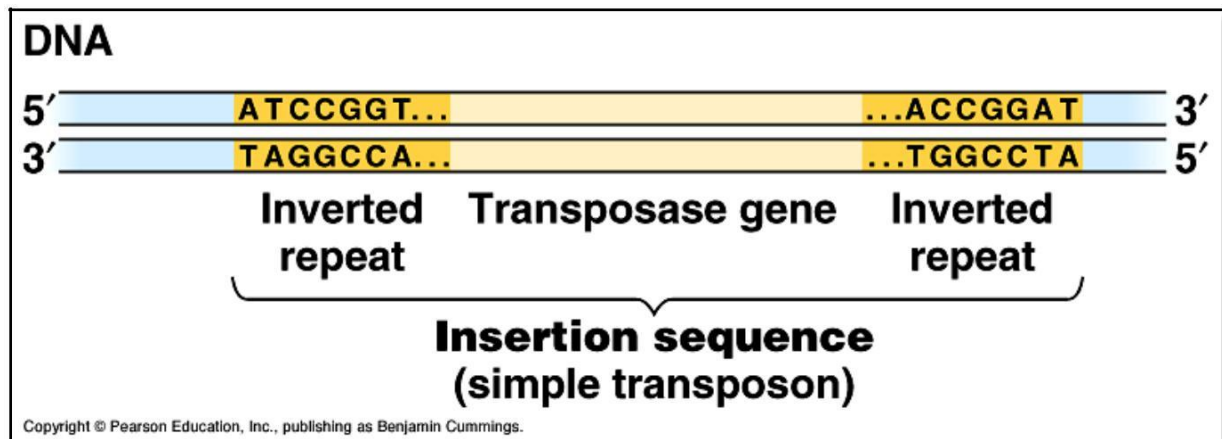
| Produit   | Criteres d'hygiene des procédés  |
|---|----------------------------------|
| Lait cru de vaches collecté   | Germes à 30°C ≤ 100000/ml (1)    |
|   | Cellules somatiques ≤ 400000 (2) |
| Lait cru d'autres espèces que les vaches  | Germes a 30°C. ≤ 1500000/ml (3)  |
| Lait cru de vaches avant transformation   | Germes a 30°C. < 300000/ml       |
| Lait ayant fait l'objet d'un traitement thermique pour fabrication de produits laitiers                   | Germes a 30°C < 100000/ml        |
| Lait d'espèces autres que les vaches, pour fabrication de produits au lait cru sans traitement thermique. | Germes à 30°C. ≤ 500000/ml       |

(1) Moyenne géométrique variable constatée sur une période de deux mois, avec au moins deux prélèvements par mois.

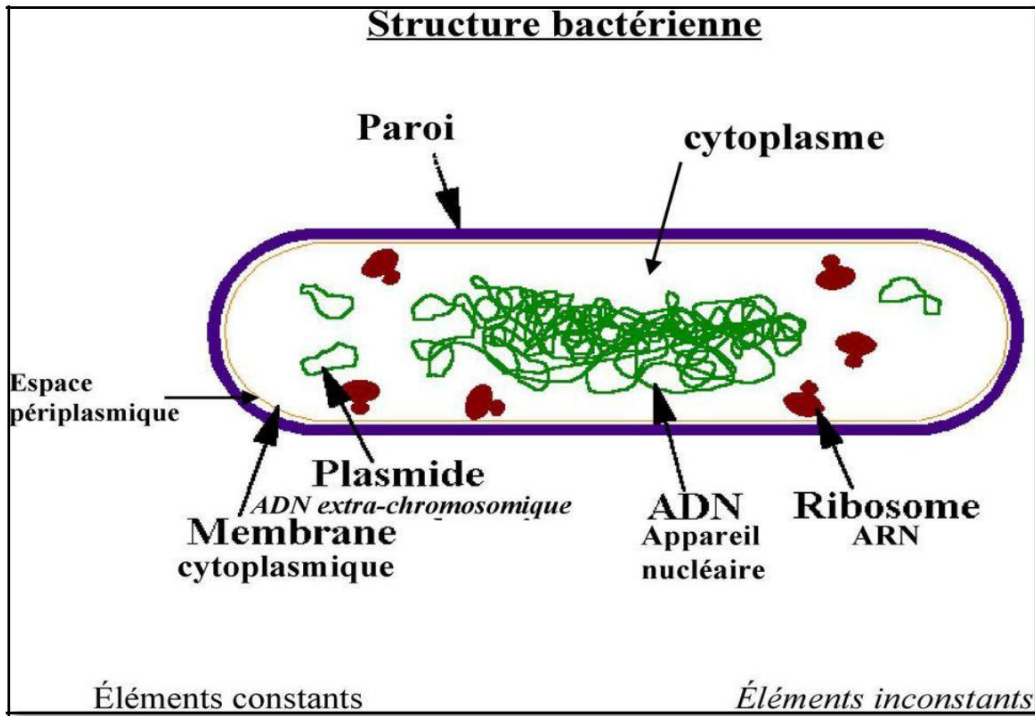
(2) Moyenne géométrique variable constatée sur une période de trois mois, avec au moins un prélèvement par mois.

(3) Moyenne géométrique variable constatée sur une période de deux mois, avec au moins deux prélèvements par mois

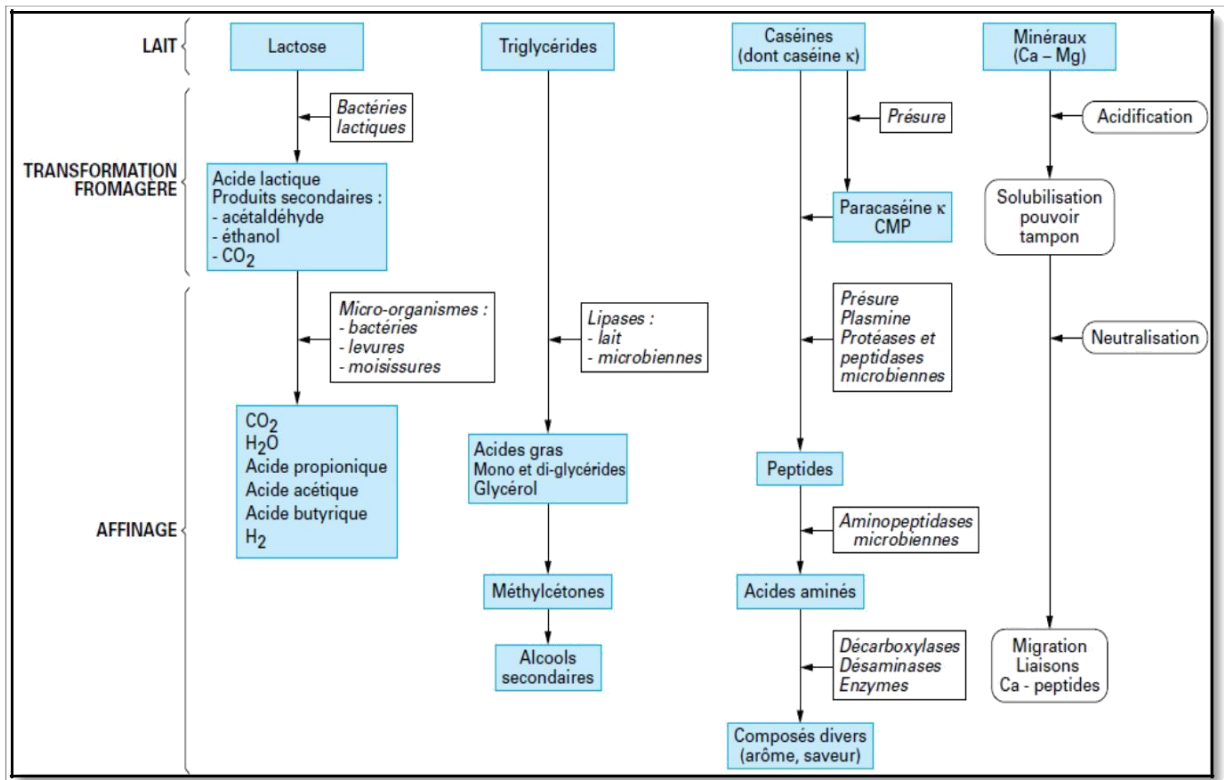
**Annexe 2 :** Séquences d'insertion (IS)



**Annexe 3 : Structure bactérienne**

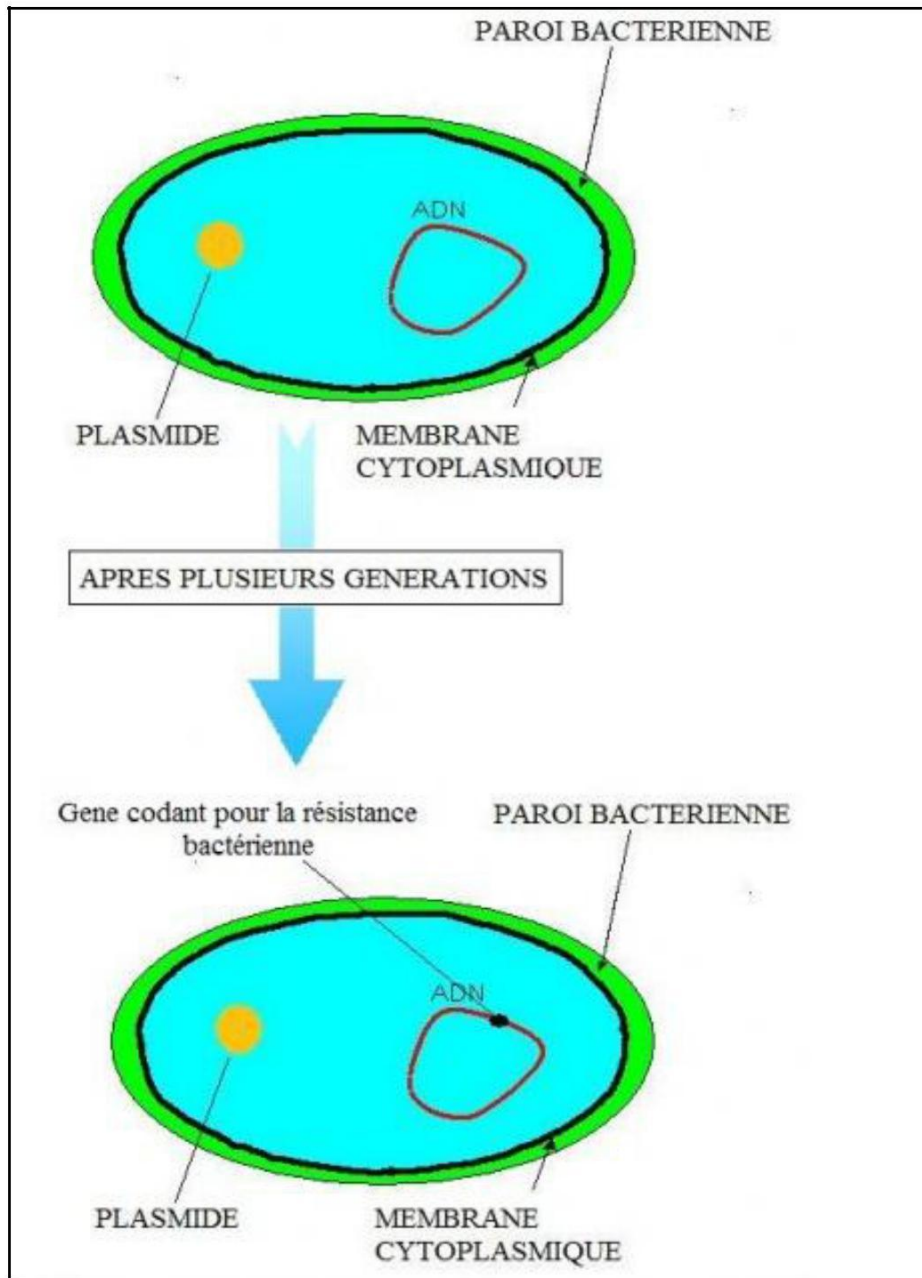


**Annexe 4 : Principales transformations des composants du lait lors de la préparation du fromage**





**Annexe 5 : Résistance naturelle des bactéries à la pénicilline**



## Résumé

La prévalence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les aliments prêts à consommer, y compris les produits à base de fromage, est un problème sérieux de la santé publique. Les objectifs de cette étude étaient de déterminer les mécanismes génétiques potentiels impliqués dans le développement, la maintenance et la dissémination de la résistance aux antibiotiques et les risques de l'antibiorésistance dans l'industrie fromagère. La présence des microorganismes résistants aux antibiotiques dans le fromage a plusieurs origines : elle peut se faire par l'utilisation des ferments lactiques ou des microorganismes de l'affinage qui sont résistants aux antibiotiques ou par une contamination au niveau de l'un des stades de fabrication ce qui cause un grand risque pour la santé humaine. Face à l'émergence des souches résistantes aux antibiotiques dans les aliments notamment le fromage la priorité est évidemment de lutter contre la diffusion de ces microorganismes.

**Mot clé :** antibiorésistance, bactéries lactiques, industrie laitière, fromage

## Summary

The prevalence of antibiotic-resistant bacteria in direct-consumption foods, including cheese products, has been a significant public health problem. The objectives of this study were to determine the potential genetic mechanisms involved in the development, maintenance and spread of antibiotic resistance and the risk of antimicrobial resistance in the cheese industry. The presence of antibiotic-resistant microorganisms in cheese has several origins, it can be done by the use of lactic ferments or ripening microorganisms which are resistant to antibiotics or by contamination at the level in one of the stages of manufacture, which causes a big risk to human health. The emergence of strains resistant to antibiotics in food, especially cheese, the priority which is obviously is to combat the spread of these microorganisms.

**Key words:** antibiotic resistance, lactic acid bacteria, dairy industry, cheese .

## ملخص

ان انتشار البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية في الأطعمة ذات الاستهلاك المباشر، بما في ذلك منتجات الجبن، كان مشكلة صحية عامة كبيرة. هدفت هذه الدراسة إلى تحديد التحولات الجينية المحتملة التي ينطوي عليها تطور وثبات وكذلك انتشار المقاومة للمضادات الحيوية وخطر مقاومة مضادات الميكروبات في صناعة الجبن. وجود الكائنات الحية الدقيقة المقاومة للمضادات الحيوية في الجبن له عدة أصول، ويمكن أن يتم ذلك عن طريق استخدام الخمائر اللبنيّة أو الكائنات الحية الدقيقة في عملية نضج الجبن أو التلوث على مستوى واحدة من مراحل التصنيع، مما يسبب خطراً كبيراً على الصحة البشرية. مع ظهور سلالات مقاومة للمضادات الحيوية في الغذاء، وخاصة الجبن، فإن الأولوية كما هو واضح تكمن في مكافحة انتشار هذه الكائنات الحية الدقيقة.

**الكلمات المفتاحية :** مقاومة المضادات الحيوية. البكتيريا اللبنيّة. صناعة الالبان. الجبن .،