



Sensibilité aux désinfectants des *Escherichia coli* porteurs d'une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération de type CTX-M

Sarah Robiolle, Agnès Perrin-Guyomard, Christophe Soumet

► To cite this version:

Sarah Robiolle, Agnès Perrin-Guyomard, Christophe Soumet. Sensibilité aux désinfectants des *Escherichia coli* porteurs d'une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération de type CTX-M. *Chimie analytique*. 2012. <anses-00731854>

HAL Id: anses-00731854

<https://hal-anses.archives-ouvertes.fr/anses-00731854>

Submitted on 13 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sensibilité aux désinfectants des *Escherichia coli* porteurs d'une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération de type CTX-M

Stage de Master 2 Microbiologie Appliquée et Génie
Biologique

2011/2012

ANSES
Laboratoire de Fougères
BP 90203
35302 Fougères Cedex
02.99.94.78.78

Responsables scientifiques :

Agnès Perrin Guyomard : agnes.perrin-guyomard@anses.fr

Christophe Soumet : christophe.soumet@anses.fr



Auteur :
Sarah Robiolle
22 avenue du Général de Gaulle
78600 Maisons Laffitte
06.59.87.64.49



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes responsables scientifiques, Madame Agnès Perrin Guyomard, et Monsieur Christophe Soumet pour m'avoir accompagné et pour leur écoute tout au long de mon stage. Je les remercie pour la richesse et la qualité des enseignements donnés.

Je remercie aussi, Madame Patricia Legrandois, Madame Béatrice Anger-Lemaitre ainsi que Madame Catherine Poirier pour leur formation au niveau techniques et pour leur soutien dans la bonne réalisation de mes travaux de recherche.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Michel Laurentie pour son aide dans la réalisation et l'interprétation des analyses statistiques.

Je remercie également Monsieur Pascal Sanders, directeur du Laboratoire, pour son accueil au sein du site de Fougères.

Pour finir j'adresse mes remerciements à l'ensemble du personnel du laboratoire de Fougères qui a contribué, de près ou de loin, à la bonne réalisation de mon étude.

Un grand Merci...

Liste des Figures

Liste des Figures :

Figure 1 : Schéma d'une microplaque pour la mesure des CMI antibiotiques

Figure 2: Protocole d'adaptation aux biocides

Figure 3: Mesure de la Concentration Minimale Bactéricide (Macrométhode)

Figure 4: Distribution des CMI ($\mu\text{g/ml}$) des biocides (BC, Chx et Hex) en fonction de la sensibilité aux C3G (BLSE ou non BLSE) des 29 souches étudiées

Figure 5: Réduction logarithmique moyenne du nombre de bactéries en fonction des concentrations de BC, pour les souches adaptées (AD)

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Description des différents biocides étudiés

Tableau 2 : Description des *E. coli* étudiés

Tableau 3: Répartition du nombre de souches sensibles aux C3G (non BLSE, n=15) et de souches présentant une résistance aux C3G (BLSE, n=14) en fonction de leurs CMI ($\mu\text{g/ml}$) à 12 antibiotiques

Tableau 4 : Profil de sensibilité aux trois biocides étudiés (BC, Chx et Hex), des *E. coli* sensibles (souches non BLSE, n=15) et résistants (souches BLSE, n=14) aux C3G, au 1^{er} et 7^{ème} passage

Tableau 5: Augmentation moyenne (+/- écart type) des CMI des trois biocides (BC, Chx et Hex) pour les souches sensibles (non BLSE) et résistantes (BLSE) aux C3G adaptées

Tableau 6: Augmentation moyenne de la CMI des biocides (BC, Chx et Hex) pour les souches non BLSE et BLSE, suite à l'adaptation à chacun des biocides

Tableau 7: Distribution des *E. coli* sensibles aux C3G (souches non BLSE), adaptés (AD) et non adaptés (NA) au BC, en fonction des CMI à 12 antibiotiques

Tableau 8: Distribution des *E. coli* résistants aux C3G (souches BLSE), adaptés (AD) et non adaptés (NA) au BC, en fonction des CMI à 12 antibiotiques

Tableau 9: Profil de sensibilité des *E. coli* sélectionnés pour les essais de détermination de la concentration minimale bactéricide au BC.

Liste des annexes

Annexe 1 : Analyse statistique comparant les différentes catégories de souches BLSE, selon leur CMI à l'ensemble des trois biocides (BC, Chx et Hex), avec ou sans la souche 11 DJ-19

Annexe 2 : Analyse de la souche 11 DJ-19 par PCR

Annexe 3 : Concentrations minimales inhibitrices aux trois biocides étudiés (BC, Chx et Hex), obtenues pour les *E. coli* sensibles aux C3G (souches non BLSE)

Annexe 4 : Concentrations minimales inhibitrices aux trois biocides étudiés (BC, Chx et Hex), obtenues pour les *E. coli* porteurs d'une résistance aux C3G (souches BLSE)

Annexe 5 : Concentrations minimales inhibitrices à 12 antibiotiques, des *E. coli* sensibles aux C3G (souches non BLSE) (11 DJ-01 à 11 DJ-15 : Catégorie 1b) et des *E. coli* résistants aux C3G (souches BLSE) commensaux aviaires (11 DJ-16 à 11 DJ-25 : Catégorie 1a)

Annexe 6 : Concentrations minimales inhibitrices à 12 antibiotiques, des *E. coli* pathogènes porteurs d'une résistance aux C3G (souches BLSE) d'origine aviaire (11 DJ-27 à 11 DJ-36 : Catégorie 2) et d'origine humaine (11 DJ-37 à 11 DJ-46 : Catégorie 3)

Annexe 7 : Distribution des *E. coli* sensibles aux C3G (souches non BLSE), adaptés (AD) et non adaptés (NA) à la chlorhexidine, en fonction des CMI à 12 antibiotiques

Annexe 8 : Distribution des *E. coli* résistants aux C3G (souches BLSE), adaptés (AD) et non adaptés (NA) à la chlorhexidine, en fonction des CMI à 12 antibiotiques

Annexe 9 : Distribution des *E. coli* sensibles aux C3G (souches non BLSE), adaptés (AD) et non adaptés (NA) à l'hexamidine, en fonction des CMI à 12 antibiotiques

Annexe 10 : Distribution des *E. coli* résistants aux C3G (souches BLSE), adaptés (AD) et non adaptés (NA) à l'hexamidine, en fonction des CMI à 12 antibiotiques

Tables des matières

Abréviations	1
Présentation de l'entreprise	2
I) Introduction	3
II) Synthèse bibliographique	4
II) 1. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	4
II) 2. Les Antibiotiques	
II) 2. a Généralités	4
II) 2. b La résistance aux Céphalosporines de 3 ^{ème} génération (C3G)	5
II) 3. Les biocides	
II) 3. a Généralités	6
II) 3. b Caractéristiques des biocides étudiés	7
II) 3. c La tolérance aux biocides étudiés	8
II) 4. Relation entre tolérances aux biocides et résistances aux antibiotiques	
II) 3. a Contexte général	9
II) 3. b Lien entre résistance aux antibiotiques et tolérance aux biocides étudiés	10
III) Matériels et Méthodes	11
III) 1. Les souches bactériennes	11
III) 2. Biocides et Antibiotiques	11
III) 3. Test de sensibilité aux biocides et aux antibiotiques (phase 1)	
III) 3. a Mesure de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des souche aux biocides	12
III) 3. b Mesure de la CMI des souches aux antibiotiques	12
III) 4. Adaptation des souches aux biocides (phase 2)	13
III) 5. Mesure de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) (phase 3)	13
III) 6. Analyses statistiques	14
IV) Résultats	15
IV) 1. Détermination de la sensibilité des souches aux biocides et aux antibiotiques	
IV) 1. a Choix des souches	15
IV) 1. b Sensibilité des souches aux trois biocides étudiés (BC, Chx et Hex)	15
IV) 1. c Sensibilité des souches aux antibiotiques	16
IV) 2. Adaptation des souches au chlorure de benzalkonium, à la chlorhexidine et à l'hexamidine	
IV) 2. a Impact de l'adaptation sur la sensibilité au biocide concerné	17
IV) 2. b Impact de l'adaptation à l'un des trois biocides sur la sensibilité croisée aux autres biocides	19
IV) 2. c Impact de l'adaptation au chlorure de benzalkonium sur la sensibilité aux antibiotiques	19
IV) 3. Détermination de la concentration minimale bactéricide	22
V) Discussion	24
VI) Conclusion et Perspectives	27
Bibliographie	28
Annexes	31

Abréviations

AD : Adapté

AMP : Ampicilline

ATB : Antibiotiques

BC : Chlorure de benzalkonium

BLSE : Béta lactamases à spectre étendu

C3G : Céphalosporines de 3^{ème} génération

CAZ : Ceftazidime

CHL : Chloramphenicol

Chx : Chlorhexidine

CIP : Ciprofloxacine

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMB : Concentration minimale bactéricide

CTX : Cefotaxime

CTX-M : CefoTaXimase-Munich

E. coli : *Escherichia coli*

FFN : Florfenicol

GEN : Gentamicine

Hex : Hexamidine

NA : Non adapté

NAL : Acide nalidixique

QAC : Composé d'ammonium quaternaire

SMX: Sulphaméthoxazole

STR : Streptomycine

TET: Tétracycline

TMP: Triméthoprime

Présentation de l'entreprise

L'Anses, ou Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, est née le 1^{er} Juillet 2010, suite à la fusion de l'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) et de l'Afsset (Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail). L'Anses a comme principale mission la sécurité sanitaire dans les domaines de la santé humaine, animale et végétale. C'est un établissement public, sous la tutelle des Ministères de la Santé, de l'Agriculture, de l'Environnement, du Travail et de la Consommation.

Son budget annuel est de 130 millions d'euros dont 5 millions d'euros par an utilisés pour soutenir les appels à projet de recherche.

L'Agence assure la surveillance épidémiologique et la veille sanitaire. Elle en analyse et en évalue les risques dans les domaines de la santé au travail, de l'alimentation, du bien être animal et de la santé végétale, afin d'assurer la sécurité des travailleurs et des consommateurs. Elle développe également de nouvelles méthodes de diagnostic et d'analyse pour un meilleur contrôle sanitaire et une meilleure gestion des risques.

L'Anses possède des relations étroites avec plusieurs organismes, qu'ils soient français, européens ou encore internationaux (l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, la Commission européenne (Direction générale de la santé et du consommateur, l'Institut Pasteur de Paris, l'Inra, l'Inserm,...).

L'Agence est composée de 1350 agents, répartis sur l'ensemble du territoire français, avec un total de 12 laboratoires ; celui de Fougères est Laboratoire National de Référence (LNR) pour les résidus de médicaments vétérinaires et la résistance antimicrobienne, ainsi que Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LR-UE) pour les résidus d'antibiotiques. Le laboratoire est actuellement composé de 4 unités dont l'unité Produits d'Hygiène Antimicrobiens (PHAM) et l'unité Pharmacocinétique-Pharmacodynamie (UPP), dans lesquelles j'ai effectué mon stage. Leur rôle est d'évaluer les bénéfices (efficacité) et les risques (résistance) liés à l'utilisation des antibiotiques et des désinfectants, dans les filières agro-alimentaires.

I) Introduction

Durant ces 2 décennies, le nombre de souches porteuses d'une bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE), notamment de type CTX-M, n'a cessé d'augmenter.² Ce constat se traduit par un développement de souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération (C3G), antibiotique qui, aujourd'hui, est un des derniers traitements face au développement de bactéries résistantes. Aujourd'hui la résistance aux C3G est donc devenue très préoccupante, avec une augmentation de son incidence, notamment dans les infections nosocomiales, passant de 0.21 à 0.40 pour 1000 patients, par jour, en France, entre 2005 et 2008.³⁰ Cette présence accrue, que ce soit dans les milieux vétérinaire ou hospitalier, peut s'expliquer par l'utilisation intensive et inappropriée de cet antibiotique durant ces dernières années, entraînant une pression de sélection, ayant comme résultat l'augmentation et le développement de souches présentant une résistance. De plus, le caractère mobile des gènes de résistance, se situant sur des éléments génétiques transposables, tel que les plasmides ou encore les intégrons, permet une transmission aisée d'une espèce bactérienne à une autre, mais aussi de l'animal à l'Homme, et inversement.

Parmi les souches présentant une résistance aux C3G, les *Escherichia coli* (*E. coli*) sont en nette progression ces derniers temps, avec une augmentation de 50% entre 2008 et 2010, dans la plupart des pays européens (rapport 2010 de l'EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network)). Dans ces isolats, 65 à 100% ont été identifiés comme étant producteurs de bêta lactamases à spectre étendu (<http://www.euro.who.int/>). En conséquence, cette bactérie impose aujourd'hui une surveillance rigoureuse, au niveau de l'évolution de sa résistance aux antibiotiques, due à l'augmentation des infections qui lui sont associées, que ce soit en milieu communautaire ou hospitalier. En effet, suite à une enquête effectuée en 2006, *E. coli* a été identifié comme étant responsable de 25% des infections nosocomiales en France (<http://www.inserm.fr/>).

Une des stratégies pour lutter contre la diffusion de ces bactéries, est l'utilisation de biocides comme les antiseptiques ou les désinfectants. Cependant, comme pour les antibiotiques, un usage incorrect de ceux-ci peut entraîner une sélection de bactéries présentant une diminution de sensibilité à ces produits. De plus, certains auteurs ont remarqué que cette augmentation de tolérance était, dans certains cas, accompagnée d'une résistance à certains antibiotiques.²⁶

Suite à ce constat, l'objectif de cette étude était de savoir si la persistance et l'augmentation de ces souches BLSE de type CTX-M, dans les milieux vétérinaire et hospitalier, peut s'expliquer par une sensibilité réduite aux biocides et représenter un avantage sélectif.

II) Synthèse bibliographique

1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) est une bactérie, le plus souvent non pathogène, faisant partie de la flore commensale du tractus digestif de l'homme ainsi que de celle de la plupart des animaux à sang chaud. Elle demeure très répandue dans l'environnement, que se soit au niveau des sols, des eaux ou encore des aliments. Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, eux-mêmes étant des bacilles à Gram-négatif. *Escherichia coli* peut être à l'origine de pathologies intestinales ou extra intestinales, pouvant se manifester notamment lors d'infections urinaires, génitales, hépatobiliaires et méningées. Pour différencier les isolats d'*E. coli*, une classification a été établie en fonction des antigènes se trouvant à leur surface. Ce sont les antigènes O somatiques (constituant une partie de la membrane externe de la paroi bactérienne et correspondant à l'endotoxine bactérienne), les antigènes K capsulaires (correspondant à la capsule polysaccharidique), les antigènes H flagellaires (constitués de flagelline, assurant la mobilité des bactéries) et les antigènes F (présents chez les souches ayant une propriété d'adhésion). *E. coli* n'exige pas de conditions particulières de cultures, et est observable sous forme de colonies rondes, de 2 à 3mm de diamètre, non pigmentées.

Les isolats pathogènes possèdent des gènes de virulence, pouvant coder pour des toxines ou encore des adhésines, généralement localisées sur des éléments génétiques mobiles tels que les transposons ou les plasmides. Ils peuvent être aussi trouvés au niveau de grandes régions (jusqu'à 200kb) particulières du chromosome bactérien, appelées « îlots de pathogénicité ».

Chaque année, *E. coli* est responsable de 2 millions de morts dans le Monde suite à des diarrhées ou à des pathologies extra-intestinales. Cette bactérie est impliquée dans 50 à 60% des cas d'infections urinaires et représente un quart des infections nosocomiales, notamment chez les patients immunodéprimés ayant bénéficié auparavant de différents traitements antibiotiques.¹⁷

2. *Les antibiotiques*

a) Généralités

Un antibiotique est défini comme étant « une substance d'origine naturelle, semi-synthétique, ou synthétique, qui à une concentration *in vivo*, tue ou inhibe la croissance de microorganisme par interaction avec une cible spécifique » (FAO/WHO/OIE, 2007).⁴ La plupart des antibiotiques interagissent spécifiquement sur certaines cibles cellulaires impliquées dans un des processus clés de la bactérie (réplication ADN, transcription, synthèse des protéine) via

des liaisons spécifiques aux ribosomes, à l'ADN, ou encore aux composés de la paroi cellulaire.¹⁵ Les antibiotiques sont utilisés à titre préventif ainsi qu'à titre curatif, chez l'homme ou chez l'animal. Il y a quelques années, ils étaient aussi administrés comme facteur de croissance, dans le domaine vétérinaire, avant que cela ne soit interdit par l'Union Européenne en 2006.²⁶ Leur utilisation massive ou inappropriée a eu pour conséquence le développement et la sélection de bactéries pathogènes ou commensales résistantes. L'apparition de la résistance chez ces bactéries peut être due à des mutations chromosomiques ou à la présence d'éléments génétiques mobiles (intégrons, plasmides) augmentant le risque de transfert de ces gènes d'une bactérie à l'autre.²⁷ Les mécanismes impliqués dans la résistance sont : la mutation du site de fixation de l'antibiotique, l'inactivation ou la dégradation de l'antibiotique par des enzymes, les mécanismes d'efflux, la diminution de la perméabilité suite à une modification de la membrane bactérienne (diminution du nombre de porines ou altération de la structure des LPS). La résistance aux antimicrobiens n'est pas nécessairement observée chez une seule classe d'antibiotique, comme le montre le développement de souches multi-résistantes aux antibiotiques, dont le principal mécanisme impliqué est un système d'efflux. Les pompes à efflux permettent l'expulsion de la cellule d'un large spectre de molécules de structure chimique différente, telles que les colorants, les métaux, les antibiotiques et les biocides, pouvant conférer à la bactérie un phénotype de résistance général.²⁰ Face à cette menace, le nombre d'options thérapeutiques diminue, menant même dans certains cas à l'échec thérapeutique.¹³

b) La résistance aux Céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G)

Les céphalosporines appartiennent au groupe des β lactamines. Elles possèdent un noyau β lactame et un noyau dihydrothiazine. Comme l'ensemble des β -lactamines, les céphalosporines agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne, suite à une fixation aux protéines liant les pénicillines (PLP), qui sont des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane.^{2, 15} Elles sont des dérivés de synthèse ou hémi synthèse des céphalosporines naturelles extraites des champignons *Cephalosporium*, proche des *Penicillium*. A l'heure actuelle, elles sont classées en quatre générations selon leurs caractéristiques, leurs spectres d'activité et leurs dates de commercialisation. Les C3G, introduites sur le marché au début des années 1980 (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone), possèdent un large spectre d'action, et elles sont souvent utilisées dans le traitement des infections sévères à Gram- (www.antiinfectieux.org/).

Cependant, au cours de ces deux dernières décennies, leur consommation n'a cessé d'augmenter dans le Monde entier, s'accompagnant du développement important de souches résistantes. A ce jour, plusieurs mécanismes impliqués dans la résistance aux β -lactamines ont été décrits tels que la diminution de la perméabilité membranaire, l'expression augmentée de système d'efflux, une faible affinité pour les PLP.^{1, 20} Cependant le principal mécanisme est la production d'enzymes, les β -lactamases. Ces enzymes entraînent une hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame, présent chez toutes les β -lactamines, y compris les céphalosporines.

Parmi les enzymes permettant à la bactérie de résister aux céphalosporines de 3^{ème} génération il existe notamment les céphalosporinases de type chromosomique ou plasmidique (exemple CMY) et les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) d'origine plasmique. Les enzymes plasmidiques sont plus préoccupantes car leur caractère mobile, leur permet de diffuser horizontalement, au sein d'une même espèce, ou même entre espèces différentes.

Les premières β -lactamases plasmidiques ont été décrites dans les années 1960. Mais c'est en 1985, que fut décrite la première BLSE, ayant la capacité d'hydrolyser les céphalosporines à spectre élargi.²

Les premières BLSE, furent des dérivés de TEM (TEMoneira (nom du patient)) et de SHV (SulfHydryl Variable). Ce fut à la fin des années 1990, que de nouvelles BLSE furent observées, dénommées CTX-M (CefoTaXimase Munich), dû au fait qu'elles hydrolysent préférentiellement le cefotaxime.² Leur apparition a bouleversé la situation épidémiologique mondiale avec une présence prédominante dans beaucoup de pays, dont la France, et un nombre qui ne cesse d'augmenter depuis le début du siècle, notamment chez les *Enterobacteriaceae*.²²

Les gènes codant pour la résistance aux C3G, comme les gènes *bla*_{CTX-M}, sont portés par des plasmides, où sont souvent localisés d'autres gènes conférant une résistance à d'autres antibiotiques (fluoroquinolone, aminoglycosides, trimethoprim et sulphamethoxazole).⁸

Ces plasmides transférables permettent une dissémination des gènes de résistance plus aisée entre bactéries, représentant un réel risque en termes de sécurité sanitaire.

3. Les biocides

a) Généralités

Les biocides sont définis comme des substances actives ou des préparations contenant une ou plusieurs substances actives, destinées à détruire, inactiver ou repousser tous les organismes dangereux. Parmi ceux-ci nous distinguons les produits biocides (désinfectants, conservateurs,

antiseptiques) qui agissent sur les bactéries, en inhibant leur croissance (activité bacteriostatique) ou en les tuant (activité bactéricide).²⁰ Contrairement aux antibiotiques, les biocides ont un large spectre d'activité en étant bactéricide, fongicide, sporicide ou encore virucide.⁴ Selon leur concentration, les biocides ont une ou plusieurs cibles à l'intérieur de la cellule.³ Ainsi, à forte concentration, le biocide cible plusieurs sites tandis qu'à faible concentration, le site d'action est plus spécifique.¹⁹ Néanmoins, la membrane cytoplasmique reste le site d'action principal.⁷ Ainsi, une fois la membrane cytoplasmique endommagée, les biocides peuvent réagir avec des protéines ou des acides nucléiques, et entraîner la coagulation des constituants cytoplasmiques ou encore une inactivation enzymatique.^{7,27}

L'utilisation des biocides est très variée, que ce soit dans les établissements de soins de santé, dans les biens de consommation (produits cosmétiques, soins personnels, nettoyage), dans les industries alimentaires (désinfection des installations et des appareils en contact avec les denrées alimentaires, décontamination des carcasses d'animaux,...), ou encore dans les stations d'épurations des eaux.¹² Leur utilisation dans les milieux hospitaliers a une place prépondérante, pour la prévention et la lutte contre les infections nosocomiales.³ Contrairement aux antibiotiques, l'usage des biocides n'est pas contrôlé en santé humaine et animale. Aussi le tonnage des principaux biocides produits reste inconnu dans l'Union Européenne.⁵ Cependant, en 2006, la vente des biocides a été estimée entre 10 et 11 milliards d'euros avec une prévision de croissance d'environ 4-5% par an, dans les prochaines années en Europe.²⁰

D'une façon identique aux antibiotiques, l'utilisation massive des biocides dans des conditions non optimales peut contribuer à la sélection de bactéries tolérantes à ces biocides. Les mécanismes de tolérance aux biocides comprennent des mécanismes similaires à ceux décrits pour les antibiotiques. Les deux principaux étant la modification de la composition de la paroi membranaire et l'efflux par des protéines membranaires.

b) Caractéristiques des biocides étudiés

Notre étude s'intéressera à l'impact de trois biocides, sur une sélection de souches d'*E. coli*, appartenant aux familles des ammoniums quaternaires (QAC), des biguanides et des diamidines. Ces trois composés sont considérés comme étant stables avec une action spécifique et des caractéristiques assez semblables (Tableau 1).

Biocides	<i>Chlorure de Benzalkonium</i>	<i>Chlorhexidine</i>	<i>Hexamidine</i>
Familles	Ammoniums quaternaires (QAC)	Biguanides	Diamidines
Spectre d'activité	Principalement Gram+ Bactériostatique Bactéricide à forte concentration ¹²	Large spectre d'action contre Gram+ et Gram- Amélioration du spectre d'activité en combinaison avec d'autres biocides (<u>ex</u> : QAC) ^{3,15}	Principalement Gram+ Gram- à forte concentration ¹⁵
Cibles	Paroi cellulaire, et plus spécifiquement les phospholipides membranaires ¹⁵	Paroi cellulaire ^{3,15}	Paroi cellulaire
Mode d'action	Formation d'agrégats micellaires Fuite du matériel cytoplasmique. ¹⁵ Inactivation des protéines et des enzymes ¹⁰	Destruction de la membrane cytoplasmique Précipitation des constituants intracellulaires ^{3,15}	Fuite cytoplasmique. Précipitation des constituants intracellulaires ¹⁵
Propriétés	Désinfectant, Antiseptique, Conservateur, Désodorisant	Désinfectant, Antiseptique, Conservateur	Antiseptique
Domaines d'utilisation	Industries agro-alimentaire, médical, domestique	Industries agro-alimentaire, médical, domestique	Médical

Tableau 1 : Description des différents biocides étudiés

c) La tolérance aux biocides étudiés

La tolérance, encore appelée diminution de la sensibilité dans le cadre de notre étude, des bactéries aux biocides est apparue suite à la mauvaise utilisation et l'usage répété de produits contenant ces molécules. Cette diminution de sensibilité est moins bien connue, comparé à celle rencontrée avec les antibiotiques. Toutefois, elle a été documentée pour quelques produits, parmi lesquels nous trouvons les composés d'ammoniums quaternaires, et plus particulièrement le chlorure de benzalkonium (BC).²⁵ La diminution de sensibilité aux QAC se traduit de façons différentes telle qu'une hyperproduction de pompes à efflux, ou une perméabilité diminuée de la membrane (modification des lipopolysaccharides, des phospholipides ou des protéines de la membrane).¹⁰

Différentes études ont ainsi décrit une variété de gènes de résistance portés par des plasmides ou situés sur le chromosome (ex : gène *qac*), existant chez des bactéries Gram+, ainsi que chez des Gram-.²⁷ De plus, le gène *qac* (quaternary ammonium compound), codant pour la résistance aux ammoniums quaternaires, serait aussi associé à une résistance à la chlorhexidine.³ Chez *E. coli*, la présence de pompes à efflux (de type AcrAB) impliquée dans la résistance à des désinfectants contenant du chlorure de benzalkonium, a été décrit lors d'études précédentes. De plus, Langsrud *et al* (2004) ont souligné la relation existant entre

une réduction du nombre de porine OmpF et l'acquisition spontanée de résistance au chlorure de benzalkonium, chez *E. coli*.¹¹

Concernant les deux autres biocides utilisés lors de notre étude (Hexamidine (Hex) et Chlorhexidine (Chx)), les connaissances actuelles sur les diminutions de sensibilité bactérienne sont peu documentées. Ainsi, le gène *cepA*, codant pour un mécanisme d'efflux, a été décrit comme pouvant être impliqué dans la résistance à la chlorhexidine. Ce gène a été majoritairement identifié chez des bactéries pathogènes Gram-.¹⁸

4. Relation entre tolérance aux biocides et résistance aux antibiotiques

a) Contexte générale

Une mauvaise utilisation des biocides peut donner lieu à la présence de concentrations résiduelles contribuant à la sélection de bactéries tolérantes à ces molécules.⁵ De plus, certains mécanismes d'actions et de résistances étant identiques entre les biocides, des auteurs ont pu montrer que cette diminution de sensibilité aux désinfectants participait à l'émergence de la résistance aux antibiotiques et/ou à la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques.^{20, 24}

Cependant, l'existence d'un lien éventuel entre une tolérance augmentée aux biocides et une résistance aux antibiotiques restent très controversée par la communauté scientifique.

Différentes études permettent d'établir toutefois 3 situations dans lesquelles il existe clairement un risque de relation entre une diminution de sensibilité aux biocides et une résistance aux antibiotiques:

- Quand les gènes de résistances aux antibiotiques et aux biocides sont portés par le même élément génétique,
- Ou encore, lorsqu'une mutation d'un gène affecte à la fois la sensibilité à un biocide et à un antibiotique,
- Lorsque le mécanisme de résistance concerne des substances avec une structure différente (comme les biocides et les antibiotiques).⁷

La modification de la perméabilité ou encore l'altération du site cible sont des mécanismes de résistances similaires aux biocides et aux antibiotiques,^{20, 21} mais le mécanisme commun le plus souvent impliqué sont les pompes à efflux, spécifique à une ou plusieurs molécules.²⁶ Les mécanismes à efflux capables de véhiculer de multiples molécules de structure chimique différente, sont généralement codés par des chromosomes et leur expression résulte, dans la plupart des cas, de mutations au niveau des gènes de régulation. Les mécanismes à efflux spécifique sont, quand à eux, majoritairement codés par des gènes situés au niveau de plasmides et/ou d'éléments génétiques mobiles tel que les transposons ou les intégrons.¹⁸

L'exposition des bactéries aux désinfectants ou aux antibiotiques entraînent dans certaines conditions, la surexpression des systèmes d'efflux, conduisant à la résistance des micro-organismes à la fois aux biocides et aux antibiotiques.^{10, 16}

b) Lien entre résistance aux antibiotiques et tolérance aux biocides étudiés

L'existence d'un lien entre une résistance aux antibiotiques et une tolérance aux biocides utilisés lors de notre étude, est principalement documentée, à ce jour, pour le chlorure de benzalkonium.

Le mécanisme impliquant les pompes à efflux est le plus souvent décrit. Ainsi, suite à une adaptation au chlorure de benzalkonium chez *E. coli*, Langsrud *et al* (2004) ont trouvé une augmentation de la tolérance à plusieurs antibiotiques, et une des différences observées au niveau de ces souches était une amélioration de l'efflux.¹¹ Chez *E. coli*, deux types de pompes à efflux, médiant à la fois l'export de QAC et d'autres agents antimicrobiens, ont été mis en évidence : la pompe à efflux AcrAB-TolC et OqxAB. Les pompes à efflux AcrAB-TolC sont chromosomiques et sont responsables de l'export du chloramphenicol, de la chlorhexidine, du triclosan, de l'ampicilline, de l'acide nalidixique, de la tétracycline et de la rifampicine. La pompe à efflux plasmidique OqxAB, permet l'export du chlorure de benzalkonium, du triclosan, du chloramphenicol, des quinolones, des triméthoprimes et des quinoxalines.^{10, 21} Les déterminants codant pour cette pompe sont localisés au niveau d'un plasmide, sur un transposon adjacent aux gènes responsables de la résistance aux β -lactamines.¹⁰

Dans le cas des systèmes d'efflux transmembranaire d'origine plasmidique, les gènes *qac* sont localisés à proximité de gènes de résistance aux antibiotiques, pouvant entraîner la résistance croisée aux biocides et aux antibiotiques lorsque la bactérie est exposée à l'une ou l'autre de ces molécules. Ainsi chez *E. coli*, le gène *qacI* (codant pour une résistance aux QACs) a été identifié au voisinage de gènes de résistances aux β -lactamines à large spectre, au chloramphénicol, aux aminoglycosides, à la rifampicine et aux sulphonamides.¹⁰ Cette configuration entraîne une diminution de sensibilité au cefotaxime, à la ceftazidime et à l'ampicilline, lorsque les souches sont mises en contact avec des concentrations croissantes de chlorure de benzalkonium.²⁵

Concernant la chlorhexidine, certaines études ont décrit l'existence d'une résistance croisée entre ce biocide, le triclosan et le chlorure de benzalkonium. En effet, suite à une adaptation au triclosan ou au chlorure de benzalkonium, les souches *E. coli* surexpriment un transporteur appartenant à la famille RND (« Resistance-Nodulation-Division ») et montrent une sensibilité réduite à la chlorhexidine.^{11, 27}

III) Matériels et Méthodes

1. Les souches bactériennes

Les souches étudiées sont des *E. coli* d'origine aviaire, pour les souches vétérinaires et d'origine humaine, pour les souches hospitalières. Elles ont été isolées soit de pathologies cliniques, soit d'animaux sains. Elles ont été classées en 4 catégories selon leur origine et leur sensibilité aux céphalosporines de 3^{ème} génération. Les souches BLSE possèdent toutes un gène CTX-M qui leur confère la résistance aux C3G. Majoritairement, elles ont des résistances associées comme la résistance à l'ampicilline, à la tétracycline et au sulphaméthoxazole. Le tableau 2 ci-dessous, décrit l'origine, la nature et le nombre des souches étudiées en fonction des différentes phases du projet.

Phases du projet	1 ^{ère} phase : Mesure de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	2 ^{ème} phase : Exposition des souches <i>E. coli</i> aux 3 biocides étudiés	3 ^{ème} phase : Mesure de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)
Nombre de souches commensales d'origine aviaire – non BLSE (Catégorie 1b)	15	15	2
Nombre de souches commensales d'origine aviaire – BLSE (Catégorie 1 a)	10	5	1
Provenance	Anses – Laboratoire de Fougères		
Nombre de souches pathogènes d'origine aviaire – BLSE (Catégorie 2)	10	5	0
Provenance	Anses – Laboratoire de Ploufragan		
Nombre de souches pathogènes d'origine humaine – BLSE (Catégorie 3)	10	5	1
Provenance	CHU de Nantes		
Total	45 souches	30 souches/biocide	4 souches/état (NA/AD)

Tableau 2: Description des *E. coli* étudiés

L'analyse statistique de la phase 1 a permis de réduire l'échantillonnage des souches BLSE, permettant de constituer 2 populations de taille identique (non BLSE/BLSE) pour l'étude de la phase 2.

Durant l'ensemble de l'étude, la souche *E. coli* ATCC25922 a été utilisée comme souche de référence.

2. Biocides et antibiotiques

Les biocides utilisés dans cette étude appartiennent à 3 familles représentatives de désinfectants, communément utilisés dans les formulations ; le chlorure de benzalkonium

(BC, famille des ammoniums quaternaires), l'hexamidine (Hex, famille des diamidines) et la chlorhexidine (ChX, famille des biguanides).

Les antibiotiques testés appartiennent à des familles d'antibiotiques utilisés à la fois en médecine vétérinaire et en médecine humaine. Au total 12 antibiotiques ont été analysés : ampicilline (AMP), ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), chloramphenicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), florfenicol (FFN), gentamicine (GEN), acide nalidixique (NAL), streptomycine (STR), sulphamethoxazole (SMX), tetracycline (TET) et trimethoprime (TMP).

3. Tests de sensibilité aux biocides et aux antibiotiques (phase 1)

La CMI correspond à la plus forte concentration d'agent antimicrobien qui inhibe la croissance bactérienne.

a) Mesure de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des souches aux biocides

Dans cette étude, la CMI aux trois biocides étudiés a été déterminée par une microméthode, à l'aide de plaques de 96 puits. Cette méthode consiste à mettre en contact les suspensions bactériennes avec des concentrations croissantes, de chacun des trois biocides. Suite à une incubation de 24 heures à 37°C, la croissance bactérienne a été évaluée par l'observation de la turbidité du milieu, dans les différents puits, dans le but de déterminer la CMI pour chacune des souches. Ce test a été effectué sur les 45 souches avant l'adaptation et les 30 isolats d'*E. coli* après adaptation, à chacun des trois biocides (c'est-à-dire 90 souches).

b) Mesure de la CMI des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée par une microméthode en milieu liquide (méthode Sensititre®). L'inoculum bactérien est distribué automatiquement, dans des microplaques, contenant différentes concentrations d'antibiotiques sous forme déshydratée (Figure 1).

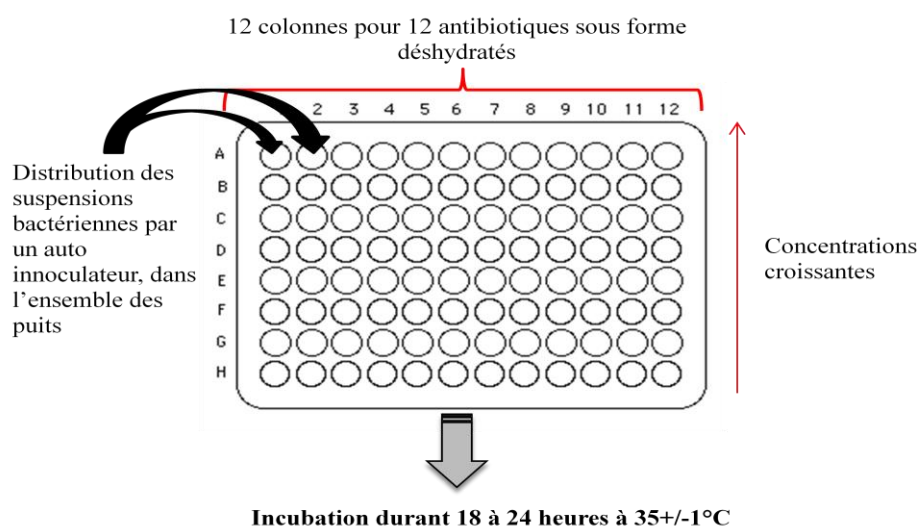


Figure 1 : Schéma d'une microplaque pour la mesure des CMI antibiotiques

Après incubation à 35°C pendant 24 heures, la CMI des antibiotiques est lue à l'aide du lecteur Vizion®. Les résultats sont transmis au logiciel SWIN, permettant d'éditer un rapport rassemblant l'ensemble des résultats pour une souche. Ce test a été réalisé pour les 45 souches d'*E. coli* non adaptées et les 90 adaptées à l'un des trois biocides.

4. Adaptation des souches aux biocides (phase 2)

L'adaptation consiste à exposer les souches d'*E. coli* à des concentrations croissantes de chacun des trois biocides, avec des contacts réitérés tous les jours durant sept jours. Cette étape du projet a été effectuée sur 30 souches au total, sachant que tous les profils d'*E. coli* ont été sélectionnés suite à un tirage au sort informatique.

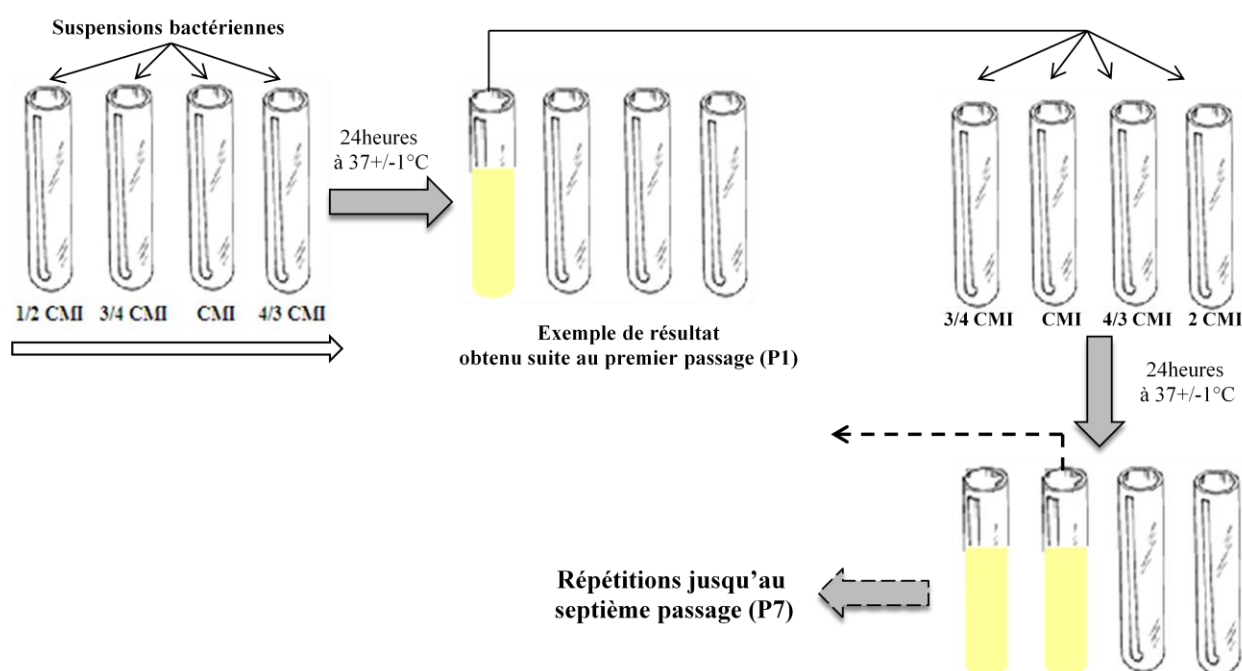


Figure 2: Protocole d'adaptation aux biocides

Pour chacune des souches testées, des tubes témoins contenant l'inoculum bactérien et le bouillon nutritif ont été traités comme décrit dans le protocole ci-dessus (figure 2), afin de voir si les passages successifs ont une influence sur la CMI de la souche concernée.

5. Mesure de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) (phase 3)

La mesure de la CMB consiste à évaluer l'effet bactéricide d'un biocide, c'est-à-dire à déterminer la concentration minimale de produit capable de tuer les bactéries après un temps de contact défini. Suite aux résultats obtenus et à l'analyse statistique réalisée à la fin de la phase 2, le chlorure de benzalkonium a été le biocide sélectionné pour la réalisation de cette dernière étape du projet. La mise au point a été effectuée en microméthode afin de déterminer

la gamme de concentration à utiliser dans le cadre de la méthode de référence. Ensuite, la CMB du chlorure de benzalkonium a été mesurée selon la norme NF EN 1276, sur 4 couples de souches, non adaptées et adaptées au chlorure de benzalkonium. La figure 3 ci-dessous décrit les différentes étapes de la méthode.

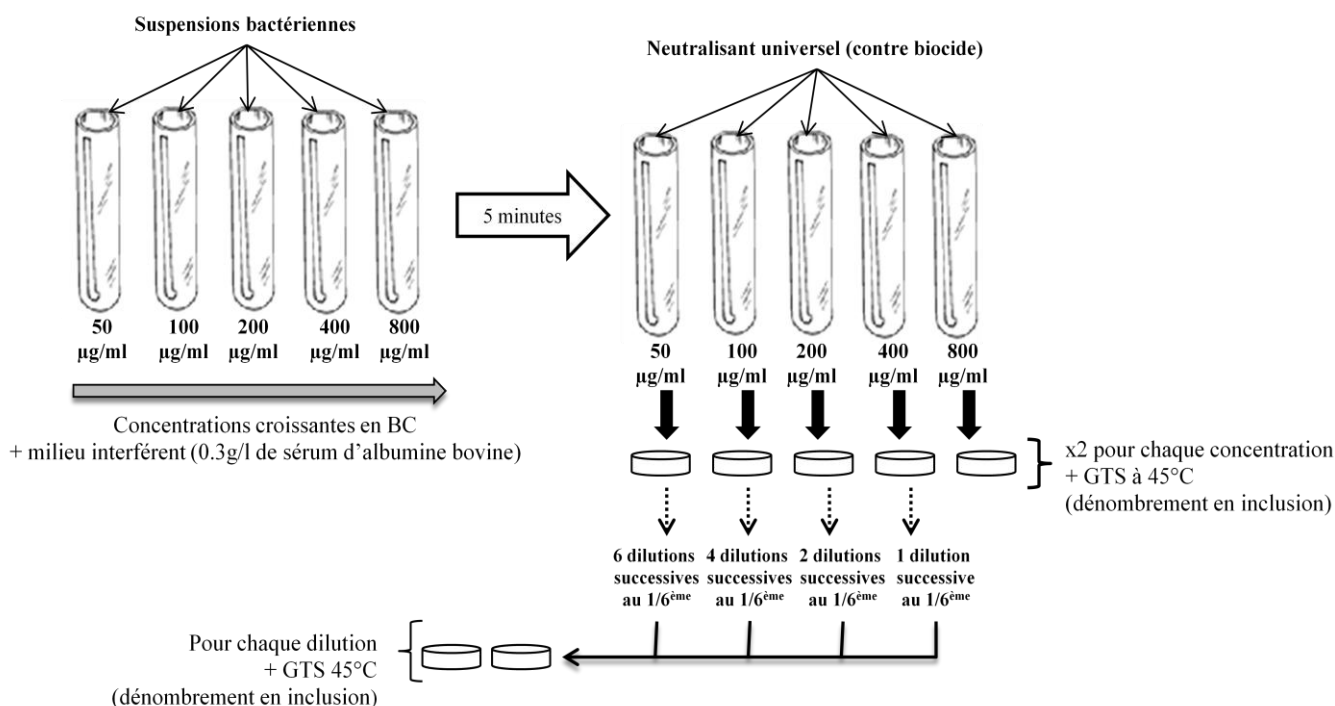


Figure 3: Mesure de la Concentration Minimale Bactéricide (Macrométhode)

Un dénombrement de l'inoculum a été effectué au départ, afin d'évaluer la quantité de bactéries présente dans la suspension bactérienne initiale. Les dénombrements bactériens après 5 minutes de contact avec les différentes concentrations de biocide ont permis de calculer le taux de survie bactérien et de déterminer la concentration de chlorure de benzalkonium nécessaire pour observer une réduction logarithmique de 5. Au total, trois répétitions ont été réalisées pour chacune des souches étudiées.

6. Analyses statistiques

Les valeurs de CMI des biocides et des antibiotiques, avant et après adaptation, pour les souches d'*E. coli* porteuses (BLSE) ou non (non BLSE) d'une résistance aux C3G, ont été comparées statistiquement par une analyse de la variance (ANOVA : Analysis of Variance), à l'aide du logiciel Systat 13. Il en a été de même pour la comparaison des réductions logarithmiques entre les deux populations de souches, avant et après adaptation au chlorure de benzalkonium.

IV) Résultats

1. Détermination de la sensibilité des souches aux biocides et aux antibiotiques

a) Choix des souches

Au début du projet, un total de 45 souches a été sélectionné pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices aux biocides et aux antibiotiques.

L'analyse statistique réalisée au cours de la phase 1 n'ayant montré aucune différence de résultats au sein des catégories de souches BLSE (catégories 1a, 2 et 3), 15 souches ont été sélectionnées au hasard parmi les 30 analysées, pour être comparées par la suite aux 15 souches de la population non BLSE (annexe 1).

Une souche faisant partie de la catégorie BLSE a été écartée au cours de l'étude car les résultats de CMI étaient aberrants par rapport à ceux de l'ensemble des autres souches. Une PCR a permis de mettre en évidence que cette souche n'était pas une *E. coli* (annexe 2).

Ainsi, lors de l'exploitation des données, seuls les résultats obtenus pour 15 souches non BLSE et 14 isolats BLSE sélectionnés, seront présentés.

b) Sensibilité des souches aux trois biocides étudiés (BC, Chx et Hex)

La première phase de l'étude (annexes 3 et 4) a permis de déterminer la sensibilité des souches d'*E. coli* aux 3 biocides (BC, Hex et Chx). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 4.

Lorsque nous comparons les valeurs de CMI entre biocides, celles pour la chlorhexidine sont plus faibles que celles pour le chlorure de benzalkonium et l'hexamidine. Elles s'étendent respectivement de 0.375 µg/ml à 1 µg/ml, de 12 µg/ml à 32 µg/ml et de 24 µg/ml à 96 µg/ml.

L'analyse comparative des valeurs de CMI des *E. coli* porteuses (BLSE) ou non (non BLSE) de résistance aux C3G, montre qu'il existe, entre ces deux populations, une différence de sensibilité aux 3 biocides. En effet, pour les souches non BLSE, environ 53% (8/15) possèdent une CMI au chlorure de benzalkonium de 24 µg/ml alors que la majorité (78%, 10/14) des souches porteuses d'une résistance aux C3G (BLSE), présentent une CMI au même biocide de 16 µg/ml. Pour 66% des souches sensibles aux C3G (non BLSE), la CMI hexamidine est de 64 µg/ml alors que pour environ 78% des souches résistantes, elle est égale ou inférieure à 48 µg/ml. Dans le cas de la chlorhexidine, environ 53% des souches non BLSE ont une CMI de 0.375 µg/ml, comme environ 78% des *E. coli* BLSE.

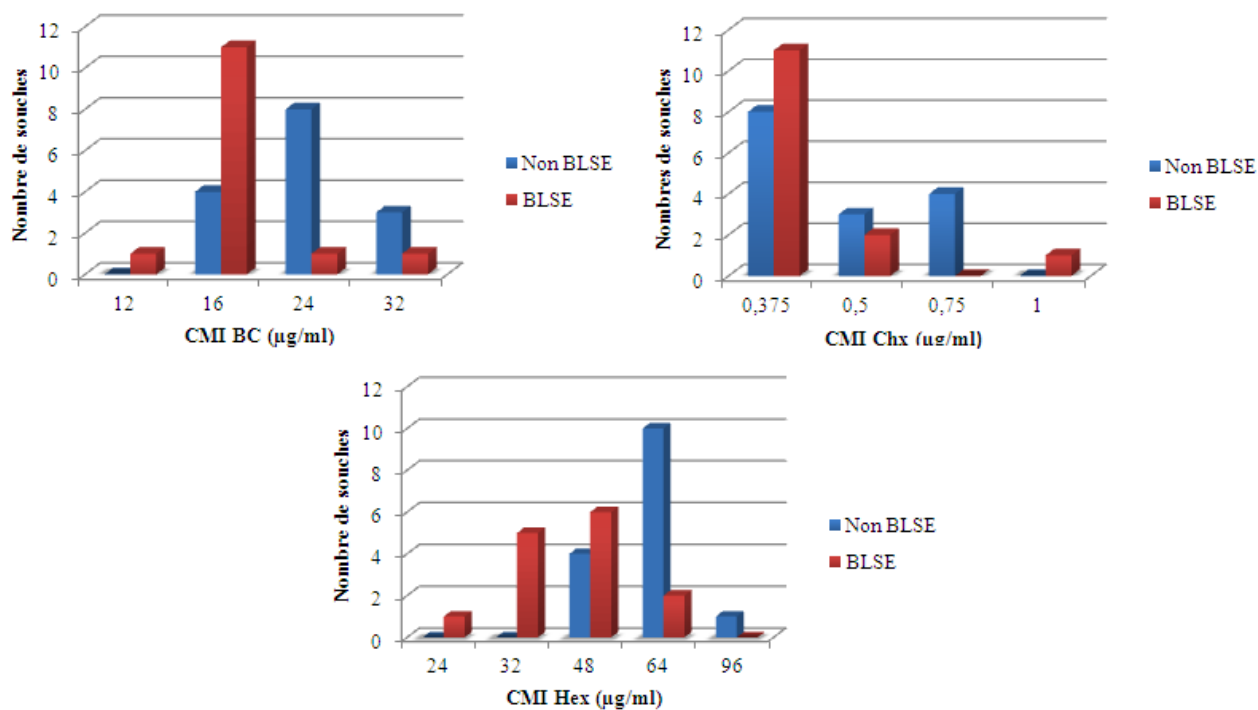


Figure 4: Distribution des CMI (µg/ml) des biocides (BC, Chx, Hex) en fonction de la sensibilité aux C3G (BLSE ou non BLSE) des 29 souches étudiées

c) Sensibilité des souches aux antibiotiques

Les profils de sensibilité aux 12 antibiotiques testés, vis-à-vis des 29 souches sélectionnées sont présentés dans le tableau 3 (annexes 4 et 5). Le pourcentage de souches résistantes a été calculé en fonction des breakpoints aux antibiotiques. Le breakpoint correspond à la concentration au-dessus de laquelle les souches bactériennes sont considérées comme résistantes cliniquement, et en dessous de laquelle les souches sont jugées comme étant sensibles, à l'antibiotique correspondant. Ainsi, la zone grisée présente dans le tableau 3 (et tableaux 8 et 9), correspond aux concentrations situées au-dessus du breakpoint et où les souches sont définies comme étant résistantes cliniquement.

D'après les valeurs de CMI et selon la valeur du breakpoint clinique de chaque antibiotique, toutes les souches testées sont sensibles au chloramphénicol (CHL), au florfénicol (FFN), à la gentamicine (GEN) et à la ceftazidime (CAZ). Cependant les valeurs de CMI à la ceftazidime obtenues pour les souches BLSE sont supérieures à celles obtenues pour les souches non BLSE. Elles sont comprises respectivement entre 1 et 4 µg/ml et 0.06 et 0.25 µg/ml. Pratiquement 100% des souches présentent une résistance à la tétracycline (TET), au sulphamethoxazole (SMX) et à l'ampicilline (AMP). Seules les souches BLSE ont des valeurs de CMI au cefotaxime (CTX) supérieures à 2 µg/ml, alors que les souches non BLSE ont des

valeurs inférieures à 0.12 µg/ml. Les taux de résistance à l'acide nalidixique (NAL), à la streptomycine (STR), et au triméthoprime (TMP), sont supérieurs chez les souches non BLSE, comparativement aux souches BLSE.

ATB	Concentrations d'antibiotique (µg/ml)															% R						
	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256		512	1024	>1024			
AMP								1	0	0	0	0	0	0	$\frac{\geq 128}{14}$					93.3		
																$\frac{\geq 128}{14}$					100.0	
CTX		3	9	3																	0.0	
									$\frac{\geq 2}{14}$													100.0
CAZ			$\frac{\leq 0.06}{1}$	10	4																	0.0
							6	8	1													0.0
CHL								$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$	3	9	1										0.0
										2	12											0.0
CIP	3	2	1	2	3	3	0	0	0	$\frac{\geq 4}{1}$												6.66
	2	6	3	0	1	0	1	0	0	1												7.1
FFN								$\frac{1}{1}$	5	8	1											0.0
										6	8											0.0
GEN					1	7	7															0.0
						6	7	1														0.0
NAL								5	1	0	0	0	3	3	$\frac{\geq 128}{3}$							60.0
								6	4	0	1	0	1	0	$\frac{\geq 128}{2}$							21.4
STR										6	1	0	0	0	2	$\frac{\geq 256}{6}$						53.3
										2	7	1	0	0	3	$\frac{\geq 256}{1}$						28.6
SMX											2	1	0	0	0	0	0	0	12			80.0
																			14			100.0
TET												6	4	5								100.0
												3	10	1								100.0
TMP					1	1	3	0	1	0	0	$\frac{\geq 16}{9}$										60.0
					1	2	5	1	0	1	0	4										35.7

Tableau 3: Répartition du nombre de souches sensibles aux C3G (non BLSE, n=15) et de souches présentant une résistance aux C3G (BLSE, n=14) en fonction de leurs CMI (µg/ml) à 12 antibiotiques

2. Adaptation des souches au chlorure de benzalkonium, à la chlorhexidine et à l'hexamidine

a) Impact de l'adaptation sur la sensibilité au biocide concerné

Les tableaux 4 et 5 ci-dessous présentent l'évolution individuelle et moyenne des profils de sensibilité des souches avant l'adaptation (premier passage) et après adaptation (septième passage) aux trois biocides testés.

Biocides	Sensibilité C3G	Passages	Concentrations de biocides (µg/ml)																					
			0.25	0.375	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4	6	8	12	16	24	32	48	64	96	128	192	256	384
BC	Non BLSE	P1												1	11	3								
		P7																4	5	5	1			
	BLSE	P1												1	9	4								
		P7																2	7	5				
Chx	Non BLSE	P1		7	8																			
		P7		1	0	0	0	1	3	3	2	4	0	1										
	BLSE	P1	4	3	7																			
		P7					2	0	1	5	4	2												
Hex	Non BLSE	P1														1	7	6	1					
		P7																1	3	2	6	3		
	BLSE	P1													1	0	5	7	1					
		P7																		2	3	7	2	

Tableau 4 : Profil de sensibilité aux trois biocides étudiés (BC, Chx et Hex), des *E. coli* sensibles (souches non BLSE, n=15) et résistants (souches BLSE, n=14) aux C3G, au 1^{er} et 7^{ème} passage

Suite à l'adaptation, la majorité des souches présente une augmentation des valeurs de CMI vis-à-vis de la molécule utilisée pour l'adaptation.

Cette augmentation est plus importante chez les souches BLSE lorsqu'elles sont mises en contact avec le chlorure de benzalkonium et l'hexamidine (tableau 5). Cependant, cette interprétation est discutable puisque l'écart type de 3.6 pour l'hexamidine est élevé.

Augmentation moyenne de CMI		
<i>Biocides</i>	<i>E. coli</i> non BLSE	<i>E. coli</i> BLSE
<i>BC</i>	3.3 (+/- 1.4)	4.4 (+/- 1.3)
<i>Chx</i>	7.8 (+/- 4.9)	8.0 (+/- 3.6)
<i>Hex</i>	2.7 (+/- 1.0)	6.2 (+/- 3.6)

Tableau 5: Augmentation moyenne (+/- écart type) des CMI des trois biocides (BC, Chx et Hex) pour les souches sensibles (non BLSE) et résistantes (BLSE) aux C3G adaptées

Concernant la chlorhexidine, l'augmentation moyenne de CMI est assez semblable entre les deux types de populations d'*E. coli*. De plus, l'adaptation des souches à cette molécule présente l'évolution de CMI la plus importante, par rapport aux deux autres biocides, avec une augmentation d'un facteur 8.

La réalisation des tubes témoins (suspensions bactériennes introduits dans du bouillon nutritif sans biocide) n'a pas mis en évidence une variation de la CMI vis-à-vis des trois biocides, chez l'ensemble des souches. Ainsi, les passages successifs réalisés durant le protocole d'adaptation, n'influence pas la sensibilité des *E. coli* vis-à-vis des désinfectants.

b) Impact de l'adaptation à l'un des trois biocides sur la sensibilité croisée aux autres biocides

Suite à la phase d'adaptation à l'un des trois biocides étudiés, la sensibilité des souches vis-à-vis des deux autres molécules a été déterminée pour chacune des deux populations (non BLSE/BLSE) et les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

Les souches adaptées à un biocide présentent également une augmentation de leur CMI, et donc une diminution de sensibilité, vis-à-vis des deux autres molécules testées. Cette augmentation semble être plus importante dans le cas des *E. coli* BLSE, mais cette tendance reste statistiquement non significative.

<u>Souches adaptées au :</u>	<u>Souches non BLSE</u> <u>Augmentation moyenne de la CMI du :</u>			<u>Souches BLSE</u> <u>Augmentation moyenne de la CMI du :</u>		
	<i>BC</i>	<i>Chx</i>	<i>Hex</i>	<i>BC</i>	<i>Chx</i>	<i>Hex</i>
<i>BC</i>		1.3 (+/- 0.6)	1.5 (+/- 0.5)		2.1 (+/- 1.2)	2.4 (+/- 0.8)
<i>Chx</i>	1.2 (+/- 0.2)		2.4 (+/- 1.3)	1.7 (+/- 0.5)		2.7 (+/- 1.2)
<i>Hex</i>	1.4 (+/- 0.4)	1.6 (+/- 0.7)		2.0 (+/- 0.5)	2.2 (+/- 1.4)	

Tableau 6: Augmentation moyenne de la CMI des biocides (BC, Chx et Hex) pour les souches non BLSE et BLSE suite à l'adaptation à chacun des biocides

c) Impact de l'adaptation au chlorure de benzalkonium sur la sensibilité aux antibiotiques

L'analyse statistique montre que les biocides ont un impact sur les CMI antibiotiques mais que celui-ci est plus important dans le cadre du chlorure de benzalkonium.

Les tableaux 7 et 8 ci-dessous présentent donc la distribution des CMI aux antibiotiques des souches sensibles (non BLSE) et résistantes aux C3G (BLSE), avant (NA) et après (AD) adaptation au chlorure de benzalkonium. Les résultats obtenus suite à l'adaptation à l'hexamidine et à la chlorhexidine sont indiquées pour information dans les annexes 7, 8, 9 et 10.

Les CMI à l'ampicilline, à la gentamycine, à la streptomycine, au sulphaméthoxazole et au triméthoprime, ne sont pas modifiées lorsque les souches, initialement sensibles aux C3G, sont mises en contact répété avec le chlorure de benzalkonium. Par contre, nous observons un déplacement des CMI vers des valeurs plus élevées dans le cas des autres antibiotiques testés. Cette augmentation est significative pour la ceftazidime, le chloramphénicol et le florfénicol (Tableau 7).

<i>ATB</i>	Etat	Concentrations d'antibiotique (µg/ml)																	%R	
		0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		>1024
AMP	NA								1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{\geq 128}{14}$	93.3
	AD									1	0	0	0	1	0	0	0	0	$\frac{\geq 128}{13}$	93.3
CTX	NA	3	9	3																0.0
	AD			1	4	6	3	0	0	$\frac{\geq 2}{1}$										6.7
CAZ	NA			$\frac{\leq 0.06}{1}$	10	4														0.0
	AD					4	7	2	1	1										0.0
CHL	NA								$\frac{1}{1}$	3	9	1								0.0
	AD											1	8	2	4					93.3
CIP	NA	3	2	1	2	3	3	0	0	0	$\frac{\geq 4}{1}$									6.7
	AD			1	5	3	0	0	3	2	$\frac{\geq 4}{1}$									40.0
FFN	NA								$\frac{\geq 2}{1}$	5	8	1								0.0
	AD										1	0	5	$\frac{\geq 32}{9}$						93.3
GEN	NA				1	7	7													0.0
	AD					10	5													0.0
NAL	NA							5	1	0	0	0	3	3	$\frac{\geq 128}{3}$					60.0
	AD									2	3	1	0	2	$\frac{\geq 128}{7}$					66.7
STR	NA									6	1	0	0	0	2	$\frac{\geq 256}{6}$				53.3
	AD									2	4	0	1	1	0	2	$\frac{\geq 256}{5}$			60.0
SMX	NA										2	1	0	0	0	0	0	12		80.0
	AD												2	1	0	0	0	0	12	80.0
TET	NA												6	4	5					100.0
	AD													2	6	$\frac{\geq 128}{7}$				100.0
TMP	NA					1	1	3	0	1	0	0	$\frac{\geq 16}{9}$							60.0
	AD						2	2	1	1	0	$\frac{\geq 16}{9}$								66.7

Tableau 7: Distribution des *E. coli* sensibles aux C3G (souches non BLSE), adaptés (AD) et non adaptés (NA) au BC, en fonction des CMI à 12 antibiotiques

Comme pour les *E. coli* non BLSE, les souches BLSE présentent une évolution de leur sensibilité à certains antibiotiques, suite à l'adaptation au chlorure de benzalkonium (Tableau 8). Nous observons une augmentation des CMI à la ceftazidime, au chloramphénicol, à la ciprofloxacine, au florfenicol, à l'acide nalidixique et à la tétracycline. La diminution de sensibilité à la ceftazidime est significative lorsque les souches étaient préalablement porteuses d'une résistance aux C3G.

ATB	Etat	Concentrations d'antibiotique (µg/ml)																	%R											
		0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		>1024										
AMP	NA												$\frac{\geq 128}{14}$						100.0											
	AD												$\frac{\geq 128}{14}$						100.0											
CTX	NA									$\frac{\geq 2}{14}$									100.0											
	AD									$\frac{\geq 2}{14}$									100.0											
CAZ	NA	6						8												0.0										
	AD	1						0		7		6												42.9						
CHL	NA	2								12												0.0								
	AD											2		5		7												85.7		
CIP	NA	2		6		3		0		1		0		1		0		1		$\frac{\geq 4}{1}$		7.14								
	AD	1		3		4		3		0		0		2		0		2		$\frac{\geq 4}{1}$		21.4								
FFN	NA	6								8												0.0								
	AD											2		2		$\frac{\geq 32}{10}$												85.7		
GEN	NA	6						7		1												0.0								
	AD	1						8		5												0.0								
NAL	NA	6						4		0		1		0		1		0		$\frac{\geq 128}{2}$		21.4								
	AD									4		6		0		0		1		$\frac{\geq 128}{3}$		28.6								
STR	NA									2		7		1		0		0		0		3		$\frac{\geq 256}{1}$		28.6				
	AD									$\frac{\leq 2}{1}$		2		6		1		0		0		1		$\frac{\geq 256}{3}$		28.6				
SMX	NA																		14	100.0										
	AD																		14	100.0										
TET	NA												3		10		1												100.0	
	AD												1		0		3		$\frac{\geq 128}{10}$											
TMP	NA	1						2		5		1		0		1		0		$\frac{\geq 16}{4}$		35.7								
	AD	2						2		5		1		0		0		$\frac{\geq 16}{4}$												28.6

Tableau 8: Distribution des *E. coli* résistants aux C3G (souches BLSE), adaptés (AD) et non adaptés (NA) au BC, en fonction des CMI à 12 antibiotiques

Pour résumer, l'adaptation au chlorure de benzalkonium entraîne, dans les conditions expérimentales de notre étude, une diminution de sensibilité des *E. coli* aux C3G (surtout

CAZ) et aux phénicolés (CHL et FFN), et celle-ci est plus importante pour la ceftazidime lorsque les souches sont porteuses d'un gène de résistance aux C3G.

3. Détermination de la concentration minimale bactéricide

L'activité bactéricide du chlorure de benzalkonium à différentes concentrations, suite à 5 minutes de contact, a été comparée sur un total de 4 souches : deux souches sensibles aux C3G (non BLSE) et deux autres résistantes aux C3G (BLSE), adaptées (A) et non adaptées (NA).

Les souches ont été sélectionnées à partir des résultats des profils de sensibilité aux biocides et aux antibiotiques obtenus suite à l'adaptation au chlorure de benzalkonium (Tableau 9). Compte tenu de l'impact significatif du chlorure de benzalkonium sur l'augmentation des CMI à la ceftazidime, au chloramphenicol et au florfénicol, dans les 2 catégories non BLSE et BLSE, les souches pour lesquelles la plus forte augmentation des valeurs de CMI pour ces 3 antibiotiques ont été choisies pour la réalisation des essais de survie avec :

- Deux souches sensibles aux C3G (non BLSE), 11 DJ-03 et 11 DJ-14, présentant la plus forte augmentation de CMI aux C3G (CTX et CAZ) comparée aux autres souches,
- Deux souches résistantes aux C3G (BLSE), 11 DJ-22 et 11 DJ-40, présentant l'augmentation la plus importante de CMI aux phénicolés (FFN et CHL)

Souches 11 DJ-	Etat	Concentration des biocides (µg/ml)			Concentrations d'antibiotiques (µg/ml)												
		BC	Chx	Hex	AMP	CAZ	CTX	CHL	CIP	FFN	GEN	NAL	STR	SMX	TET	TMP	
03	NA	24	0.5	64	>128	0.12	0.12	8	0.5	8	ND	>128	16	>1024	128	>16	
	AD	96	0.5	96	>128	4	>2	128	4	>32	1	>128	32	>1024	>128	>16	
14	NA	24	0.375	48	>128	0.12	0.06	8	0.03	4	1	2	8	16	32	0.5	
	AD	48	0.75	96	>128	1	0.5	32	0.25	>32	1	16	8	32	>128	1	
22	NA	32	0.5	64	>128	1	>2	8	0.015	4	0.5	2	8	>1024	64	1	
	AD	64	0.75	96	>128	8	>2	32	0.06	>32	0.5	16	4	>1024	128	0.5	
40	NA	24	0.375	48	>128	1	>2	8	0.03	4	0.5	2	4	>1024	64	0.25	
	AD	48	0.5	96	>128	4	>2	64	0.12	>32	1	16	8	>1024	>128	2	

Tableau 9: Profil de sensibilité des *E. coli* sélectionnés pour les essais de détermination de la concentration minimale bactéricide au BC

La survie des souches non adaptées et adaptées au chlorure de benzalkonium est présentée sur la figure 5. Plus la concentration de chlorure de benzalkonium augmente, plus la réduction logarithmique moyenne augmente.

La réduction logarithmique moyenne du titre bactérien est plus faible pour la souche sensible aux C3G 11 DJ-14, aux concentrations de 50 et 100 µg/ml de chlorure de benzalkonium (Figure 5). Aux concentrations de chlorure de benzalkonium de 200 et 400 µg/ml, la souche résistante aux C3G, 11 DJ-40, a un taux de survie plus important. Toutefois, toutes ces observations ne sont pas statistiquement significatives.

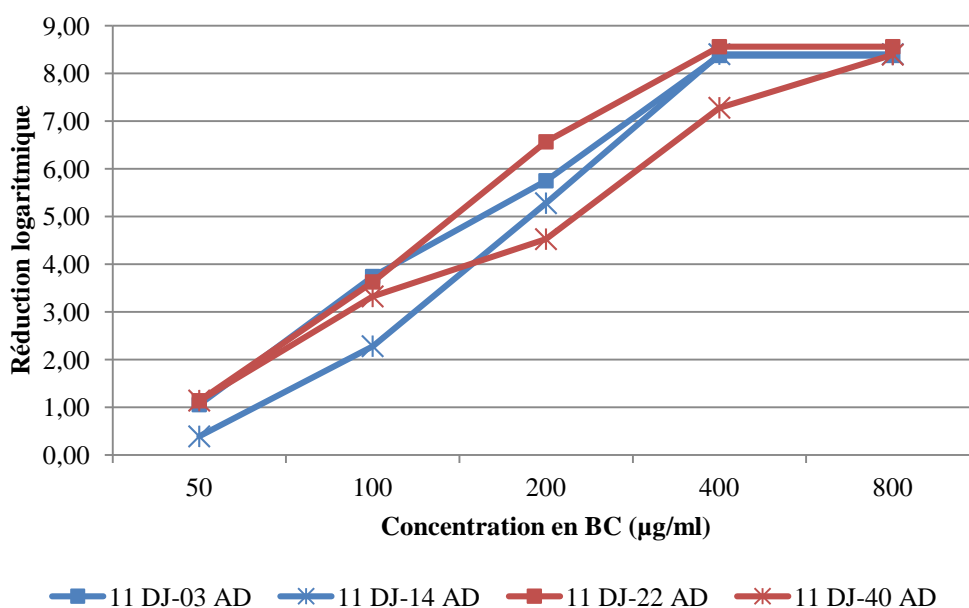


Figure 5 : Réduction logarithmique moyenne du nombre de bactéries en fonction des concentrations de BC, pour les souches adaptées (AD)

V) Discussion

Depuis leur découverte, l'usage des antibiotiques est une stratégie de lutte contre les bactéries pathogènes. Cependant, au cours de ces dernières décennies, l'utilisation massive et inappropriée des antibiotiques a entraîné le développement de mécanismes de résistances chez les espèces bactériennes, représentant un réel risque pour la santé publique. Un autre moyen de lutte contre ces bactéries est l'utilisation de biocides. Cependant, l'utilisation intensive de ces molécules a conduit au développement de bactéries devenues plus tolérantes à des biocides, voire résistantes à des antibiotiques.

La présente étude s'intéresse à la persistance, dans les domaines vétérinaires et cliniques, de souches d'*E. coli*, résistantes aux céphalosporines de troisième génération (C3G), via la production de BLSE de type CTX-M. Elle avait pour objectif de déterminer si cette persistance était associée à une augmentation de tolérance aux biocides, illustrés dans cette étude par trois molécules (Chlorure de benzalkonium, Hexamidine et Chlorhexidine) appartenant à trois grandes familles de produits désinfectants. Au total, l'étude a été construite autour de trois phases.

La première phase consistait à déterminer le profil de sensibilité à trois biocides et à 12 antibiotiques, pour deux populations d'*E. coli*, l'une résistante aux C3G par production d'une β -lactamase de type CTX-M (souches BLSE) et l'autre, sensible aux C3G (souches non BLSE). Au cours de cette première phase, la chlorhexidine est le biocide pour lequel les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont les plus faibles, quelque soit la catégorie de souches analysée. La sensibilité des souches BLSE vis-à-vis des trois biocides étudiés est plus importante (principalement à l'hexamidine et au chlorure de benzalkonium) que celle des souches non BLSE. Cependant, ces différences de sensibilité ne sont pas éloignées de plus d'une concentration, ce qui reste non significatif. Au cours d'une étude précédente, des auteurs avaient montré que des *E. coli* résistantes aux C3G, producteurs de BLSE, présentaient une sensibilité réduite à l'hexamidine comparée aux souches sensibles. Toutefois, cet article mesurait la sensibilité de souches *E. coli* BLSE à l'hexamidine pour une taille de population réduite, avec seulement 4 souches présentant des CMI de l'hexamidine variant du simple au quadruple.⁹

Concernant la mesure des concentrations minimales inhibitrices aux antibiotiques, les souches BLSE présentent des profils de sensibilité aux C3G différents des souches non BLSE, avec

des CMI beaucoup plus élevées pour les C3G (CTX et CAZ) et des taux de résistance au céfotaxime (CTX) de 100%. Ces profils de sensibilité correspondent aux critères qui avaient dicté notre choix préalable des souches (voir III-1).

Lors de la deuxième phase du projet, le but était d'évaluer si un contact réitéré avec des concentrations subinhibitrices de biocides (chlorure de benzalkonium, hexamidine et chlorhexidine) réalisé au cours d'essais d'adaptation, pouvait conduire à une modification des profils de sensibilité à ces molécules et aux antibiotiques et si cette modification était différente selon que les souches soient résistantes ou non aux C3G (BLSE ou non BLSE). Les résultats montrent une diminution de la sensibilité de la majorité des souches vis-à-vis de la molécule biocide à laquelle elles ont été adaptées. Les souches adaptées à un biocide ne sont pas significativement moins sensibles au regard des 2 autres molécules de biocides, ceci quelque soit la nature de la sensibilité aux C3G (souches BLSE ou non BLSE). Une précédente étude avait pourtant mis en évidence l'existence d'une résistance croisée entre le chlorure de benzalkonium et la chlorhexidine. Cependant, l'adaptation au chlorure de benzalkonium avait été réalisée sur une espèce bactérienne différente (bactéries lactiques) et sur une plus longue période (40 jours).²³ Ainsi, les deux populations de souches testées dans notre étude semblent développer des mécanismes de tolérance spécifique au biocide auquel elles ont été exposées durant sept passages.

L'adaptation des souches aux biocides entraîne globalement une augmentation des CMI aux antibiotiques, avec un impact plus important pour le chlorure de benzalkonium. Parmi les antibiotiques testés, ces changements de profil sont significatifs pour la ceftazidime, le florfenicol et le chloramphenicol, et concernent à la fois les populations BLSE et non BLSE. Ces résultats peuvent être mis en relation avec ceux obtenus par Langsrud *et al* où une résistance croisée entre le chloramphenicol et le chlorure de benzalkonium avait été trouvée suite à une adaptation de souches d'*E. coli* au chlorure de benzalkonium.¹¹ De même dans une autre étude, les *E. coli* adaptés au chlorure de benzalkonium présentaient une importante réduction de sensibilité aux antibiotiques phénicolés ainsi qu'aux β -lactamines, mais dans une moindre mesure.²⁵ D'un point de vue mécanistique, des auteurs ont mis en évidence l'expression importante du système *AcrAB* d'*E. coli* lorsque la bactérie est en condition de stress, comme lors d'un contact avec des désinfectants. Ce système d'efflux est impliqué dans l'export de diverses molécules tel que le chloramphénicol, la chlorhexidine et l'ampiciline.^{10,}

28

Ces résultats suggèrent qu'il existe un lien entre la tolérance augmentée au chlorure de benzalkonium et la diminution de sensibilité à certains antibiotiques mettant en jeu des mécanismes de résistances communs non spécifiques.

De plus, dans les conditions expérimentales de notre étude, l'évolution des CMI à la ceftazidime est statistiquement plus importante lorsque les souches sont préalablement porteuses d'une résistance aux C3G (souches BLSE). Ces résultats peuvent être rapprochés de précédentes études qui avaient montré que les gènes codant pour les β -lactamases de type CTX-M étaient localisés sur des intégrons de classe I, à proximité de gènes *qac* (*qacE Δ 1*), sous le contrôle d'un promoteur unique. Des contacts réitérés de chlorure de benzalkonium pourraient être à l'origine d'une expression du gène *qac*, codant pour une résistance au désinfectant, entraînant de la même manière l'expression du gène *bla_{CTX-M}*, conférant une résistance aux C3G.^{14, 29}

La méthodologie utilisée lors de cette phase de l'étude a montré quelques limites. En effet, la mesure de la CMI au niveau des antibiotiques a été réalisée à l'aide de microplaques pré-remplies contenant des concentrations fixées de chaque antimicrobien. De ce fait, plusieurs résultats montrent une concentration supérieure ou égale à la concentration la plus forte fixée ne permettant pas de déterminer précisément le facteur d'augmentation de CMI pour cet antibiotique chez certaines souches. Ce problème a notamment été rencontré lors de l'analyse des résultats de l'évolution du profil de sensibilité à la cefotaxime pour les souches BLSE, suite à l'adaptation au chlorure de benzalkonium. Ce constat est d'autant plus critique que cet antibiotique appartient à la famille des C3G.

La troisième phase de l'étude consistait à savoir si, suite à une exposition unique de 5 minutes à différentes concentrations de chlorure de benzalkonium, les souches sensibles aux C3G étaient plus facilement détruites par le biocide comparé aux souches résistantes aux C3G. Les résultats montrent tout d'abord que la réduction bactérienne, observée pour l'ensemble des souches exposées au chlorure de benzalkonium, semble être maximale à 400 μ g/ml, ce qui correspond approximativement aux concentrations d'utilisation bactéricides des produits commerciaux contenant cette molécule (allant de 200 à 1000 μ g/ml). Ainsi, cette phase du projet met en évidence que l'utilisation du chlorure de benzalkonium, en suivant les indications du fabricant, permet d'éliminer efficacement l'ensemble des souches d'*E. coli*. Les résultats obtenus ne montrent pas de différence de survie entre les souches BLSE et non BLSE, qu'elles soient préalablement adaptées ou non au chlorure de benzalkonium. Pourtant, Sidhu *et al.* ont observé que suite à une adaptation de bactéries lactiques au chlorure de benzalkonium, le taux de survie était plus important lorsque la souche avait été au contact préalable avec des concentrations subinhibitrices de chlorure de benzalkonium. Toutefois, cette étude a été réalisée chez une autre espèce bactérienne que celle de notre étude et sur une taille de population très réduite avec seulement une souche par état (adapté et non adapté).²³

VI) Conclusion et Perspectives

Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence que l'utilisation des biocides à des concentrations inférieures aux concentrations recommandées en pratique pouvait sélectionner des *E. coli* (BLSE, non BLSE) présentant une tolérance augmentée à ces biocides ainsi qu'à certains antibiotiques, dont les céphalosporines de 3^{ème} génération. Cette tolérance (ceftazidime) est significativement plus importante pour les souches *E coli* porteuses d'une résistance aux C3G (BLSE). Ces résultats suggèrent que l'utilisation répétée de BC peut contribuer à la sélection et à la persistance de ces souches. Cependant, les essais de bactéricidie en présence de BC ne montrent pas de différence de survie entre les souches BLSE et non BLSE, préalablement adaptées à ce biocide.

Toutefois, il serait intéressant d'augmenter la taille de la population de souches dans les essais de bactéricidie et d'ajouter des souches plus hétérogènes d'un point de vue phénotypique comme par exemple, les souches ne présentant pas d'évolution de profil de sensibilité aux C3G, suite à l'adaptation au BC. Il pourrait être aussi envisagé de tester si l'adaptation au BC entraîne des modifications significatives des profils de sensibilité aux antibiotiques entre des souches non BLSE et BLSE porteuses d'un gène de résistance aux C3G autre que CTX-M. De plus, afin d'évaluer la stabilité de la réponse adaptative il serait intéressant de réaliser des passages répétés des souches adaptées dans des milieux sans pression de sélection, c'est à dire en absence de biocide.

Afin d'approfondir les mécanismes de résistance non spécifiques mis en jeu lors des expériences d'adaptation au BC, des essais utilisant des inhibiteurs de pompes à efflux pourront être testés. Si les pompes à efflux sont identifiées comme un des mécanismes responsable de la tolérance au BC, des expériences d'expression de gènes (*acrAB*, *mdfA*, *emrE* ...) suspectés d'être impliqués dans ce mécanisme pourront être réalisées.

Bibliographie

1. Bingen, E. (2010) Mécanismes de résistance aux β lactamines.
2. Cattoir, V. (2008) Les nouvelles béta-lactamases à spectre étendu (BLSE). MAPAR, Pathologie infectieuse en réanimation, p. 203-209.
3. Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Interrégion Paris Nord (CLIN Paris-Nord) (2000) Antiseptiques et Désinfectants.
4. Cerf, O., Carpentier, B., Sanders, P. (2010) Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: « Resistance » has different meanings. *International Journal of Food Microbiology* **136** : 247-254.
5. Comité scientifique des risqué sanitaires émergents et nouveaux (CSRSEN) (2009) Effets des biocides sur la résistance aux antibiotiques. Résumé : « Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides ».
6. Duarte, R. S., Silva Lourenço, M. C., Souza Fonseca, L., Cardoso Leao, S., Lourdes T. Amorim, E., Rocha, I. L. L., Santana Coelho, F., Viana-Niero, C., Machados Gomes, K., Gomes da Silva, M., Suely de Oliveira Lorena, N., Bettini Pitombo, M., Ferreira, R. M. C., Henrique de Oliveira Garcia, M., Pinto de Oliveira, G., Lupi, O., Rios Vilaça, B., Rodrigues Serradas, L., Chebabo, A., Andrade Marques, E., Martins Teixeira, L. M., Dalcolmo, M., Goncalves Senna, S., Mello Sampaio, L. M. (2009) Epidemic of Postsurgical Infections Caused by *Mycobacterium massiliense*, **47** : 2149-2155
7. Freney, J., Renaud, F., Leclercq, R., Riegel, P. (2007) Résistances Bactériennes et Biocides. Dans: *Bactériologie Clinique*, 2^{ème} édition, ed. by ESKA, pp.711-719.
8. Geser, N., Stephan, R., Korczak, B. M., Beutin, L., Hachler, H. (2011) Molecular Identification of Extended-Spectrum- β -Lactamase Genes from Enterobacteriaceae Isolated from Healthy Human Carriers in Switzerland. *Journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56(3)** : 1609-1612.
9. Grare, M., Massimba Dibama, H., Lafosse, S., Ribon, A., Mourer, M., Regnouf-de-Vains, J.-B., Finance, C., Duval, R. E. (2009) Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine. *Clin Microbiol Infect* 2010 ; **16**: 432-438

10. Hegstad, K., Langsrud, S., Lunestad, B. T., Aamdal Scheie, A., Sunde, M., Yazdankhah, S. P. (2009) Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health? *Microbial Drug Resistance* **16** : 91-104.
11. Langsrud, S., Sundheim, G., Holck, A. L. (2004) Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to bezalkonium chloride or exposed to stress-inducers. *Journal of Applied Microbiology*, **96** : 201-208.
12. Linton, A. H., Hugo, W. B., Russell, A. D. (1987) Chemical disinfectants. In: *Disinfection in Veterinary and Farm Animal Practice* ed. By Linton, A. H., Hugo, W. B., Russell, A. D., pp 23-24.
13. Kempf, I., Zeitouni, S. (2009) Coût biologique de la résistance aux antibiotiques : analyse et conséquences. *Pathologie Biologie* (Paris), doi :10.1016/j.pabio.2009.10.013.
14. Martinez-Freijo, P., Fluit, A. C., Schmitz, F. J., Grek, V. S.C., Verhoef, J., Jones, M. E. (1998) Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds, **42**: 689-696
15. McDonnell, G. E. (2007) Chemical Disinfection. In: *Antisepsis, disinfection, and sterilization. Types, action, and resistance*, ed. by American Society for Microbiology, pp. 96-101, pp. 140-145 and pp. 217-251
16. Mc Mahon, Xu, J., Moore, J. E., Blair, IS., McDowell D. A. (2007) Environmental Stress and Antibiotic Resistance in Food-Related Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 211-217.
17. Montet, M.P., Vermozy-Roland, C. (2001) Taxonomie et physiologie. Dans *Escherichia coli* O57:H7, ed. par Tech.& Doc. /Lavoisier, p. 2-6.
18. Poole, K. (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **56**: 20-5.
19. Russell, A. D. (2002) Antibiotic and biocide resistance in bacteria: comments and conclusions. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, **92**: 171S-173S
20. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) (Janvier 2009) Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides.
21. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) (2010) Research strategy to address the knowledge gaps on the antimicrobial resistance effects of biocides.

22. Schink, A. K., Kadlec, K., Schwarz, S. (2011) Analysis of bla_{CTX-M} carrying plasmids from *Escherichia coli* Isolated collected in the BfT-Germ Vet Study. Applied and Environmental Microbiology, p. 7142-7146.
23. Sidhu, M. S., Langsrud, S., Holck, A. (2001) Disinfectant and Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Food Industry. Microbial Drug Resistance **7** : 73-83.
24. Sidhu, M. S., Heir, E., Leegaard, T., Wiger, K., Holck, A. (2002) Frequency of Disinfectant Resistance Genes and Genetic Linkage with β -Lactamase Transposon TN 552 among Clinical Staphylococci. Journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy **46(9)** : 2797-2803.
25. Soumet, C., Fourreau, E., Legrandois, P., Maris, P. (2012) Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*. Veterinary Microbiology, doi:10.1016/j.vetmic.2012.01.030.
26. Thorrold, C.A., Letsoalo, M.E., Dusé, A.G., Marais, E. (2007) Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E. coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. International Journal of Food Microbiology, **113**: 315-320.
27. Walsh, C., Fanning, S. (2008) Antimicrobial resistance in Foodborne Pathogens- A Cause for Concern? Current Drug Targets, **9**: 1-8
28. Webber, M. A., Piddock, L. J. (2003) The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **51**: 9-11
29. Weldhagen, G. F. (2004) Integrons and β -lactamases – a novel perspective on resistance, 556-562
30. Zahar, J. R., Masse, V., Watier, L., Lanternier, F., Degand, N., Postaire, M., Descamps, P., Nassif, X., Lortholary, O. (2011) Is hand-rub consumption correlated with hand hygiene and rate of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-PE)-acquired infections? Journal of Hospital Infection, doi:10.1016/j.jhin.2011.10.006.