UNIVERSITÉ DE LORRAINE

MASTER BioMANE
Biotechnologies Microbiologie Aliment
Nutrition Environnement

BioMANE

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Master BioMANE 1ère année

Biotechnologies, Microbiologie, Aliment, Nutrition, Environnement

Année Universitaire 2014/2015

Impact d'un traitement biocide sur la sensibilité aux antibiotiques chez une souche d'*Escherichia coli* cultivée en biofilm

Mémoire présenté par

Amandine GOULON

Stage effectué du 6 avril au 29 mai 2015
Laboratoire de l'ANSES – Fougères

encadré par SOUMET Christophe / Chef de l'Unité Antibiotiques, Biocides, Résidus et Résistance (AB2R)

Titre du stage :

Impact d'un traitement biocide sur la sensibilité aux antibiotiques chez une souche d'*Escherichia coli* cultivée en biofilm

Remerciements

Je remercie Mr. Pascal SANDERS, Directeur du Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les médicaments Vétérinaires et les Désinfectants (LERMVD) de m'avoir permis d'effectuer mon stage de Master 1 Biotechnologie Microbiologie Aliment Nutrition Environnement au sein du laboratoire de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du travail (ANSES) à Fougères.

Je remercie tout particulièrement Mr. Christophe SOUMET, mon maitre de stage, pour m'avoir accueilli dans son équipe et son service Antibiotiques Biocides Résidus et Résistance et pour m'avoir offert cette opportunité de stage. Je le remercie pour le partage de son expérience et de ces connaissances dans le milieu ainsi que pour son intérêt et son aide précieuse dans la réalisation de mon rapport.

Je remercie également :

Mme. Patricia LE GRANDOIS, technicienne microbiologiste, pour sa patience et ses conseils avisés sur toutes les techniques que j'ai pu aborder. Je la remercie pour le temps qu'elle m'a accordé malgré ses occupations et pour avoir su répondre à toutes mes interrogations.

Mme Béatrice ANGER-LEMAITRE, technicienne microbiologiste, pour sa disponibilité et son aide dans la rédaction de mon rapport.

Tous les autres stagiaires présents également au laboratoire pour leur bonne humeur quotidienne et communicative, ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur accueil sympathique et leur coopération professionnelle tout au long de ce stage.

SOMMAIRE

Liste des Annexes numérotées ……... 7

Liste des Abréviations ……... 8

1 – Introduction …… 9

Présentation de l'Entreprise ……10

2 – Synthèse ibliographique …… 12

2-1. Synthèse bibliographique **.....** 12

2-1-1. Les antibiotiques ……. 12

2-1-1-1. Situation actuelle sur l'utilisation des antibiotiques **…..** 12

2-1-1-2. Acquisition de la résistance aux antibiotiques……. 12

2-1-2. Les biocides ……. 12

2-1-2-1. Les biocides et leurs domaines d'utilisation …… 12

2-1-2-2. Diminution de la sensibilité et la résistance aux biocides…… 13

2-1-2-3. Résistance croisée entre biocides et antibiotiques……**.....** 13

2-1-3. Espèces bactériennes rencontrées en abattoirs de porc ……...……14

2-2. Contexte de l'étude……**...**14

2-2-1. Présentation du projet DABESBIO ……. 14

2-2-2. Plan de recherche ……. 14

2-2-3. Résultats attendus ……. 16

3- Matériels et Méthodes …… 17

3-1. Matériels et réactifs……. 17

3-2. Méthodes……. 18

3-2-1. Etude de la survie *d'E.coli* cultivées en biofilm. ……. 18

3-2-1-1. Au jour 1 (J1) : préparation des supports inox et de la suspension bactérienne pour la formation des biofilms……... 18

3-2-1- 2. J2 à J11 : traitement du biofilm ……**.....** 19

3-2-1- 3. A J2 et J11 : Dénombrement des bactéries survivantes **.....** 19

3-2-1-4. Conservation des bactéries récupérées. ……..... 20

3-3. Caractérisation des souches bactériennes par PCR. ……... 20

3-4. Détermination de la sensibilité *d'E.coli* aux biocides. ……... 21

3-5. Détermination de la sensibilité *d'E.coli* aux antibiotiques. …… 21

4- Résultats – Discussion …… 23

4-1. Survie *d'E.coli* cultivés biofilms sur un d'acier inoxydable…….. 23

4-2. Vérification de l'identité des bactéries……..….. 26

4-3. Sensibilité *d'E.coli* aux biocides. …… 27

4-4. Sensibilité *d'E.coli* aux antibiotiques……... 29

5- Conclusions – Perspectives …… 31

Bilan personnel ……... 32

Bibliographie …… 33

Annexes……. 36

Résumé/Abstract…… 41

Liste des Annexes numérotées

Annexe A: Préparation des matières fécales.Préparation des supports inox : étape de nettoyage.

Annexe B: Schéma expérimental d'une microplaque pré-remplie et gammes de concentrations d'antibiotiques testés pour les essais de CMI antibiotiques.

Annexe C: Mode opératoire de la détermination de la CMI des antibiotiques en milieu liquide.

Annexe D: Fiche d'enregistrement de la pureté et du dénombrement des colonies viables et cultivables.

Annexe E: Exemple d'une feuille de résultat et d'une plaque de CMI antibiotiques visualisée avec le logiciel SWIN.

Liste des abréviations :

AD :	Adapté
AFFSA :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFFSET :	Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail.
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
AMP :	Ampicilline
ANSES :	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'Alimentation, de L'Environnement et du travail.
AQ :	Ammonium Quaternaire
ATB :	Antibiotique
BC :	Chlorure de Benzalkonium
BMH	Bouillon Mueller-Hinton
BTS	Bouillon Trypticase Soja
CDDA :	Chlorure de Didécyl Diméthyl Ammonium
CHL :	Chloramphénicol
CIP :	Ciprofloxacine
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
COL :	Colistine
DO	Densité Optique
FOT :	Céfatoxime
GEN :	Gentamicine
GMH	Gélose Mueller Hinton
GTS	Gélose Trypticase Soja
IFIP	Institut de la Filière Porcine
MERO :	Méropénème
MF	Matière Fécale
NA :	Non Adapté
NAL :	Acide Nalidixique
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
R :	Résistant
S :	Sensible
SB	Suspension Bactérienne
SBE	Suspension Bactérienne d'Essai
SI	Substances Interférentes
SMX :	Sulfaméthoxazole
SNC	Solution Nutritive de Conservation
STR:	Streptomycine
TAZ:	Ceftazidime
TET:	Tétracycline
TMP:	Triméthoprime

INTRODUCTION

La présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les aliments d'origine animale représente une préoccupation majeure en santé publique. En effet, l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques peut être responsable d'échec thérapeutique. Il est bien connu que l'utilisation massive des antibiotiques en médecine vétérinaire et humaine est responsable de l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques même si certaines bactéries peuvent présenter naturellement une résistance intrinsèque à certains antibiotiques (Davison, *et al*. 2000). Cependant, d'autres facteurs sont mis en cause dans l'émergence et la dissémination de la résistance aux antibiotiques. En effet, des auteurs ont émis l'hypothèse d'un lien entre le développement de la résistance aux antibiotiques et l'utilisation de biocides comme les désinfectants en production animale (SCENIHR 2009). Ce phénomène s'explique par des mécanismes de résistance aux antibiotiques et aux biocides communs ou par la co-sélection de gènes de résistance (antibiotiques-biocides) suite à l'utilisation de biocides (Russell *et al* 2002) Il a été démontré que les bactéries sont capables de s'adapter à leur environnement sous l'effet de stress comme la température, le pH, la pression osmotique ou l'oxygène. Les conditions rencontrées en industrie qui génèrent du stress lors des procédures d'abattage sont ainsi suspectées de moduler la résistance aux antibiotiques. (McMahon, *et al*. 2007).

Mon projet de stage s'inscrit dans un projet dénommé DABESBIO, dont l'un des objectifs est de déterminer si la résistance des bactéries aux antibiotiques est modulée par les procédures de nettoyage et désinfection lors des procédés d'abattage dans les abattoirs de porcs. J'ai participé dans le cadre de mon projet de stage à la tâche 3 de ce projet. Elle consiste à évaluer la sensibilité aux biocides et aux antibiotiques d'une souche *Escherichia coli* cultivée en biofilm sur un coupon en inox suite à un traitement quotidien par un biocide pendant 10 jours. A partir de ce biofilm, les bactéries sont détachées, dénombrées et des tests de sensibilité vis-à-vis de biocides et d'antibiotiques sont réalisés.

Dans ce rapport, je vous présente l'entreprise dans laquelle j'ai réalisé mon stage, une synthèse bibliographique et les différentes méthodes que j'ai appliquées ainsi que les résultats obtenus.

PRESENTATION DE L'ENTREPRISE

Historique :

L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) a vu le jour le 1er juillet 2000 suite à la fusion entre l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) et de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET) sous la direction de Marc Mortureux, directeur général. C'est un organisme qui assure des missions de veille, d'expertise, de recherche et de référence dans plusieurs domaines : santé humaine, santé et bien-être animal ainsi que la santé végétale. L'ensemble de ces domaines couvrent de manière globale les expositions auxquelles un individu peut-être sujet.

L'ANSES en quelques chiffres :

L'Agence comprend notamment le laboratoire de l'ANSES, la Direction de l'Evaluation des risques et l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV). Elle est formée d'un réseau de 11 laboratoires de référence et de recherche répartis sur l'ensemble du territoire français et reconnu au niveau international dans divers disciplines. Elle s'appuie sur près de 1350 agents et 800 experts extérieurs.

Mon stage s'est déroulé au Laboratoire de Fougère fondé en 1975 sous le nom de laboratoire des médicaments vétérinaires. Il a été créé pour gérer l'autorisation de mise sur le marché (AMM) des médicaments vétérinaires et en évaluer la qualité, la sécurité et l'efficacité en développant notamment des compétences dans l'analyse des médicaments vétérinaires, de leurs résidus dans les denrées alimentaires ainsi que des compétences dans l'évaluation des désinfectants et des antiseptiques. Situé dans le bâtiment Bioagropolis (2012), il est devenu le laboratoire de Fougères en 2000 suite à la création de l'ANSES et emploie 70 personnes. Le laboratoire de Fougères contribue entre autres à une meilleure connaissance des bénéfices et des risques associés à l'utilisation des médicaments vétérinaires et des désinfectants par la filière agro-alimentaire. L'organigramme du laboratoire est présenté en figure 1.

Missions :

Les travaux du laboratoire de Fougères se concentrent sur 4 thématiques :

- Le dépistage des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées d'origine animale
- L'efficacité antimicrobienne des antibiotiques et des désinfectants
- La résistance à ces produits antimicrobiens
- L'évaluation de la toxicité des contaminants alimentaires (toxines, phycotoxines…)

Le laboratoire de Fougères est nommé Laboratoire National de Référence (LNR) sur les résidus de médicaments vétérinaires et sur la résistance aux antibiotiques et Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LR-UE) pour les résidus d'antibiotiques et de colorants.

Accueillie par son chef d'unité Monsieur Christophe SOUMET, j'ai intégré l'unité AB2R : Antibiotiques, Biocides, Résidus et Résistance, composé de 6 scientifiques et 9 techniciennes. Cette unité exerce ses activités dans les domaines de la sécurité alimentaire, de la médecine vétérinaire et de l'hygiène alimentaire. Ces missions sont de contribuer à l'étude des usages des produits d'hygiène antimicrobiens et antibiotiques et de leurs effets sur le risque de développement de la résistance aux antimicrobiens. Elle participe également au développement et à l'évaluation des techniques de détection des effets inhibiteurs de ces produits et de dépistage moléculaire de leurs résidus.

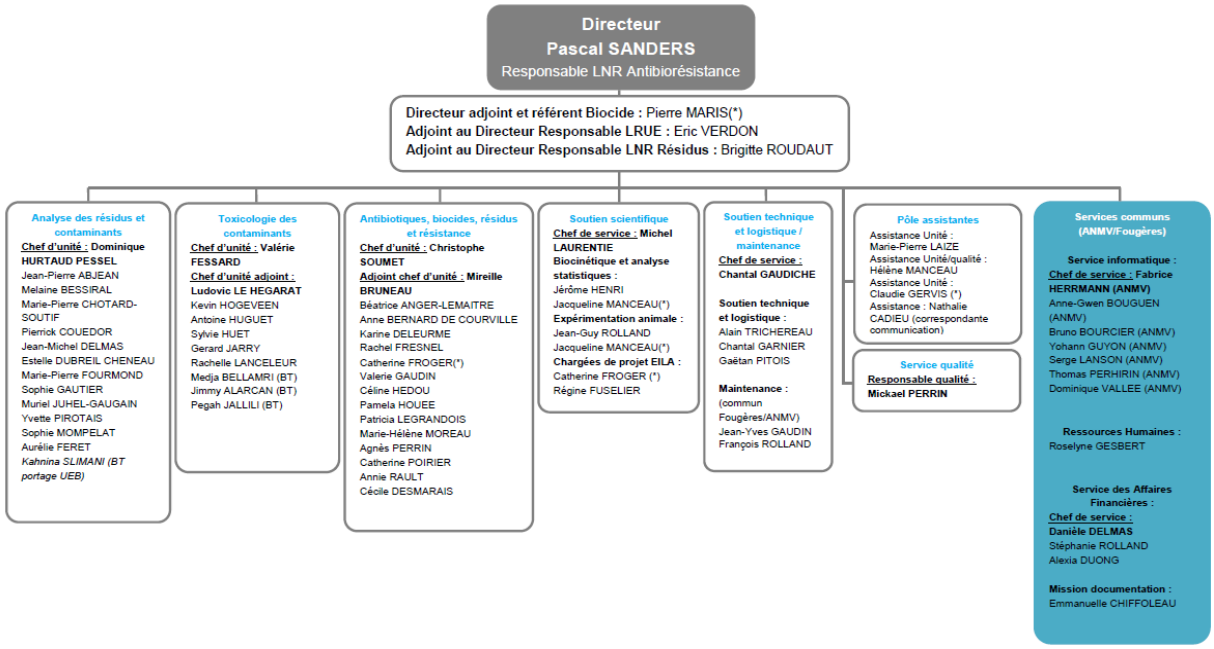


Figure 1 :Organigramme du laboratoire de Fougère 2015 (d'après *anses.fr*)

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

2-1. Synthèse bibliographique

2-1-1. Les antibiotiques

2-1-1-1. Situation actuelle sur l'utilisation des antibiotiques

Un antibiotique est une substance naturellement produite par un microorganisme ou de synthèse ayant une activité bactériostatique (inhibition de la croissance) et/ou bactéricide (destruction) sur d'autres microorganismes. Le premier antibiotique découvert fut la pénicilline, encore largement utilisé, isolé à partir d'une moisissure *Penicillium* par le biologiste et pharmacologue Ecossais Sir Alexander Fleming en 1928 (Mortureux et Ruaux, 2013).

Les antibiotiques sont utiles et indispensables pour combattre les microorganismes responsables d'infections chez l'homme et l'animal, mais leur utilisation massive et répétée, en santé humaine et animale, entraine au fil du temps une apparition et une augmentation des bactéries résistantes voire même multi-résistantes (InVS et ANSM, 2014). L'émergence et la diffusion dans l'environnement ou dans la chaîne alimentaire de ces bactéries résistantes est une préoccupation majeure en santé.

2-1-1-2. Acquisition de la résistance aux antibiotiques

En microbiologie, une souche résistante à un antibiotique dispose d'un mécanisme de résistance qui augmente la valeur de la concentration minimale inhibitrice. Ainsi, la bactérie n'est pas tuée ou inhibée par la dose d'antibiotique administrée (Peyrat, 2008). Cette résistance peut être naturelle ou acquise. L'acquisition de la résistance peut se faire par mutation(s) ou par transfert de gènes de résistance (Ministère de l'Agriculture.2011).

2-1-2. Les biocides

2-1-2-1. Les biocides et leurs domaines d'utilisation

Les biocides regroupent des substances ou des préparations destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique (SCENIHR, 2009). Ils sont utilisés dans différents domaines en médecine de ville, vétérinaire, en production alimentaire et en collectivités. Les biocides désinfectants sont classés en 6 familles majeures : les composés d'ammoniums quaternaires (AQ), les iodophores, les composés phénoliques, les

composés aldéhydes, les peroxides et les dérivés chlorés. Les composés d'ammoniums quaternaires sont les substances actives biocides les plus représentées dans les formulations commerciales. Ils s'absorbent facilement aux surfaces cellulaires et agissent au niveau de la membrane plasmique en causant une désorganisation de celle-ci puis une lyse qui entraine la mort de la cellule.

2-1-2-2. Diminution de la sensibilité et la résistance aux biocides

Les méthodes d'étude de la diminution de la sensibilité ou de la résistance au biocide se basent principalement sur la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), laquelle correspond à la plus faible concentration de biocide qui ralentit ou inhibe la croissance bactérienne. Elle est déterminée en étudiant la croissance d'une souche bactérienne après 18 à 24h dans un milieu liquide ou solide avec différentes concentrations de biocide définies. Cette méthode d'étude est réalisée sur des bactéries en suspension, or sur le terrain (ex : production animale) les bactéries sont rarement en suspension sous forme planctonique mais plutôt sous forme de biofilm. La formation de biofilm est un processus naturel et dynamique qui confère une protection physique et réduit la concentration des agents antimicrobiens tels que les biocides (Bridier *et al* ; 2011). Il est constitué d'un ensemble de cellules associées entre elles et/ou à une surface et incluses dans une matrice constituée d'exopolysaccharides bactériens. En premier lieu, les bactéries adhérent à une surface. Les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire de la bactérie et les propriétés de la surface du support jouent un rôle important dans les interactions liées à l'adhésion. Les cellules bactériennes vont ensuite s'agglutiner, se multiplier et former des microcolonies. C'est lors de la maturation du biofilm que les bactéries synthétisent la matrice d'exopolysaccharides. De plus, le biofilm peut favoriser les échanges entre bactéries de gènes de résistance aux biocides.

2-1-2-3. Résistance croisée entre biocides et antibiotiques

Lorsque les conditions d'utilisation ne sont pas correctement respectées (dose d'application, température, souillures…), les biocides peuvent se retrouver dans l'environnement à des doses inférieures à la dose létale. L'émergence de bactéries résistantes a été associée à l'utilisation massive des antibiotiques. Des hypothèses suggèrent également une relation entre la résistance aux antibiotiques et l'utilisation des biocides puisque i) des mécanismes de résistance communs sont partagés par ces molécules antimicrobiennes, et ii) des gènes de résistance aux antibiotiques et aux biocides présent portés sur un même élément génétique mobile (plasmides, transposons) peuvent être co-sélectionnés. Les conditions

rencontrées en abattoirs de porcs (pH, température …) peuvent également agir comme stress environnementaux sur les bactéries et favoriser la résistance aux antibiotiques (Peyrat, 2008)

2-1-3. Espèces bactériennes rencontrées en abattoirs de porcs

Une sensibilité diminuée vis à vis des AQ a été mise en évidence pour de nombreuses espèces bactériennes dont *Listeria monocytogenes (*Aase *et al*. 2000), *Staphylococcus* sp. (Heir *et al*, 1995), *Salmonella* et *Escherichia coli* (Braoudaki *et al*, 2004). Dans ces travaux, ces espèces bactériennes pouvaient présenter des diminutions de sensibilité, voire de résistance vis à vis des antibiotiques. Les souches *d'Escherichia coli* sont des contaminants des aliments en industrie alimentaire en particulier des aliments d'origine animale. Ce sont des bactéries commensales du microbiote intestinal de l'animal, qui peuvent se retrouver au cours de l'abattage (éviscération) sur la carcasse du porc et contaminer le produit final. La plupart des *E coli* sont non pathogènes et considérés comme des indicateurs de l'hygiène. Cependant, parfois certaines souches *d'E coli* se révèlent être des pathogènes opportunistes qui peuvent être responsables d'infections alimentaires et nosocomiales (Capita *et al*., 2014).

2-2. Contexte de l'étude

2-2-1. Présentation du projet DABESBIO

Le projet DABESBIO est un projet de recherche financé par la région Bretagne regroupant 3 laboratoires de recherche et l'Institut Technique du Porc (IFIP). Mr. SOUMET chef de projet, coordonne ce projet qui a débuté en juin 2012 et se terminera en juin 2015.

En rapport avec l'augmentation croissante de l'utilisation des biocides et des antibiotiques, ce projet vise à :

- apporter des connaissances sur les risques de sélection de bactéries résistantes à des antibiotiques à partir d'expérimentations au laboratoire simulant des conditions proches de celles de désinfection rencontrées en abattoirs de porcs.
- suivre l'évolution des espèces bactériennes rencontrées en abattoir de porcs, notamment la baisse de leurs sensibilités vis-à-vis des biocides désinfectants.

2-2-2. Plan de recherche

Le projet DABESBIO est divisé en 3 tâches. **La tâche 1** à permis de choisir les différents produits biocides à partir d'une enquête sur les pratiques de nettoyage/désinfection dans 10-15 abattoirs de porcs. Ainsi, 5 biocides ont été sélectionnés qui sont le plus souvent retrouvés dans la composition des produits commerciaux : le chlorure de didécyldméthyl ammonium (CDDA), le chlorure de benzalkonium (BC), le Galox Horizon, le peroxyde

d'hydrogène et l'hypochlorite de sodium. Ces produits biocides sont notamment utilisés sur des flagelleuses qui interviennent au niveau du cycle d'échaudage, d'épilation et de flambage et qui servent notamment à finir le travail de la peau en grattant la carcasse de porc et en éliminant toutes les soies ou morceaux de soies restés sur la carcasse.(cf. figure 2).

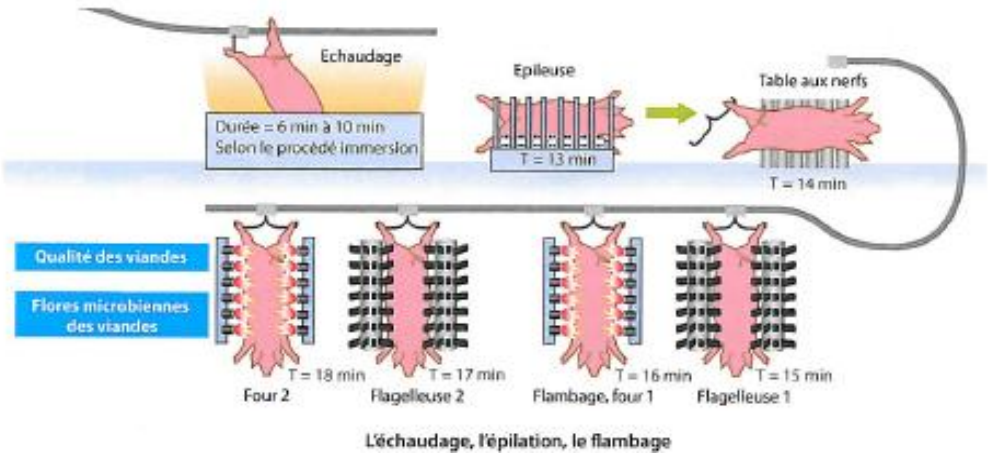


Figure 2: Processus d'abattage en industrie du porc

Cependant, du fait de contraintes techniques, les surfaces utilisées pour le projet n'ont pas été des portions de flagelleuses mais des coupons inox, lesquels sont également largement retrouvés en abattoirs de porcs. Une collection de souches, à partir de prélèvements terrain et de collections déjà constituées par les différents partenaires, a également été établie en ciblant 4 espèces bactériennes préoccupantes en industrie de production porcine*: Listeria, Campylobacter*, *Escherichia Coli* et *Salmonella*. Les souches ont été sélectionnées sur leur critère phénotypique (de sensibilité aux antibiotiques) et sur leur diversité génotypique (profils d'électrophorèse en champs pulsés, PFGE). Différents paramètres ont également été déterminés : la charge en matières organiques (matières fécales), la quantité de bactéries en contact et présente sur les flagelleuses. **La tâche 2** est centrée sur i) la connaissance de la sensibilité vis à vis des biocides et antibiotiques des souches sélectionnées ii) la capacité d'adaptation des bactéries exposées à des concentrations croissantes de biocide et iii) le transfert de résistance aux antibiotiques entre les bactéries. **La tâche 3** est centrée sur l'impact du traitement biocide sur l'évolution de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries sélectionnées lors des tâches précédentes. Elle se compose de 2 sous-tâches. La sous-tâche 3.1 se divise en 3 étapes :

- La mise au point d'un protocole pour étudier la survie en biofilm monomicrobien de souches bactériennes sur des coupons inox

- L’étude de la survie en biofilm monomicrobien des souches bactériennes cultivées sur des coupons inox ayant subi un traitement quotidien par un biocide répété à 8 reprises
- La détermination de la sensibilité aux antibiotiques et aux biocides sur les souches bactériennes récoltées du biofilm après 1 et 8 traitements par le biocide

La tâche 3.2 est identique à la tâche 3.1 mais elle concerne l’étude de biofilms mixtes de 2 espèces bactériennes.

J’ai participé dans le cadre de mon projet de stage à la tâche 3.1 du projet DABESBIO. Ainsi, un biofilm *d’E.coli* à été réalisé sur des coupons inox et traité quotidiennement avec un produit biocide (Galox Horizon) afin de déterminer la survie *d’E.coli* en biofilm après 8 traitements. La sensibilité de la souche *E coli* vis-à-vis de biocides (BC, CDDA et Galox Horizon) et d’antibiotiques a été réalisée après un 1er et un 8ème traitements.

2-2-3. Résultats attendus

Les résultats du projet DABESBIO devront permettre d’améliorer les processus de nettoyage/désinfection, déterminer les éventuelles résistances croisées entre biocide(s) et antibiotique(s) et d’appréhender le mode de transmission de ces résistances.

MATERIELS ET METHODES

3-1. Matériels et réactifs.

- **Souches bactériennes :** La souche étudiée pour les essais est *E.coli* (EC04), qui a été isolée en d'abattoir de porcs au cours des premières tâches du projet. La souche de référence *E.coli* ATCC25922 est utilisée pour les essais de détermination de sensibilité. L'ensemble des manipulations se fait sous PSM (poste de sécurité microbiologique).
- **Préparation des matières fécales** : Les matières fécales sont représentées par des souillures fécales liquides prélevées dans un abattoir de porcs breton. Elles ont été ensuite stérilisées par filtration (voir Annexe A)
- **Préparation des supports inox** : Les supports utilisés pour la formation des biofilms et sur lesquels sont appliqués les traitements sont des supports en inox glacé 316L 2B de 1 cm x 2 cm compatible en alimentaire (Société Métallurgique et Industrielle de l'Ouest SMIO, 35300 Fougères).
- **Biocides :** Les biocides sélectionnés pour cette étude sont des composés utilisés majoritairement en abattoirs de porcs. Le Galox Horizon (Penngar, S.a) est une spécialité liquide incolore pour la désinfection des matériels en industrie alimentaire avec un large spectre d'activité bactéricide. Il est homologué par le Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des affaires Rurales. Il est composé de glutaraldéhyde (50 g/l) et Ammonium quaternaire (25 g/l) avec une dose d'emploi sur le terrain de 0,6 à 1 %. Le Chlorure de Didécyl-Diméthyl Ammonium (CDDA) (Merck KGaA, Allemagne) est une substance active biocide qui se présente sous la forme d'une solution aqueuse incolore. Le Chlorure de benzylammonium (BC) (Stepan Europe, Voreppe) est composé d'un mélange de chlorure d'alkyl (C14, C16, C18) dimethylbenzylammonium. Ces deux substances actives peuvent rentrer dans la composition de produits biocides commerciaux en association avec d'autres substances actives et excipients.

3-2. Méthode.

3-2-1. Etude de la survie de *E coli* cultivées en biofilms

3-2-1-1. Au jour 1 (J1) : préparation des supports inox et de la suspension bactérienne pour la formation des biofilms

- **Préparation des supports en inox** : Les supports inox sont préparés selon le protocole d'un guide pratique pour la réalisation d'essais d'adhésion et de biofilms en laboratoire en cours de publication (ACTIA – Conception hygiénique des lignes et équipements et amélioration de la nettoyabilité). Le détail de ce protocole est présenté en Annexe A.
- **Préparation de la culture de travail :** A partir de la culture stock, un isolement de la souche sur une boite de gélose Trypticase Soja (GTS) au sang est réalisé puis incubé entre 18 et 24h à 37°C. Cette manipulation correspond à notre 1^{er} passage. Ce 1^{er} passage est utilisé pour sélectionner 2-3 colonies ensemencé dans 10 mL de Bouillon Trypticase Soja (BTS), incubé de 18 à 24h à 37°C. Ceci correspond à notre $2^{ème}$ passage.
- **Préparation de la suspension bactérienne (SB) :** La suspension bactérienne est centrifugée et le culot est remis en suspension dans 10 mL d'eau physiologique peptonée. Cette étape de lavage est réalisée deux fois. Sur le culot est ajouté la quantité d'eau physiologique peptonée nécessaire (10 mL) pour obtenir une densité optique (DO) à 0.5 +/- 0.02. Dans le but de valider la préparation de cette suspension, celle-ci est diluée au $1/10^{ème}$ de -2 à -7 dans de l'eau physiologique peptonée afin de réaliser un dénombrement. Pour cela, 100 µL des dilutions 10^{-6} et 10^{-7} sont déposés en surface de boîtes de milieu GTS. Les bactéries sont comptabilisées après puis incubation à 37°C pendant 18 à 24h.
- **Préparation de la suspension bactérienne d'essai (SBE):** Pour les suspensions bactériennes d'essai (SBE), 1 volume (V) de SB à la dilution 10^{-4} est ajouté à 1V de matières fécales.
- **J1 : Préparation des biofilms et du biocide (Galox Horizon):** 80 µL de SBE (ce qui correspond à environ 4.10^3 Unités Formant Colonies par mL (UFC/mL) sont déposés sur les supports inox. Les supports inox sont répartis, bien séparés les uns des autres, dans une boite de Pétri elle-même placée dans une boite carrée maintenue humide. L'ajout de petits tampons de papier absorbant humidifiés avec 10 mL d'eau stérile évite le desséchement de la suspension pouvant entrainer une perte bactérienne. L'ensemble est mis à incuber à l'étuve à 37°C pendant 20h pour permettre la formation du biofilm. Les supports sont prévus en double pour être analysés après un traitement (T1) et 8 traitements (T8). Les solutions de Galox Horizon sont diluées dans l'eau dure CEN afin d'obtenir une concentration active (0,6% qui est la dose d'emploi), et quatre concentrations intermédiaires non actives (0,05 et

0,025% et 0,0125% et 0,0625%) permettant une réduction de quelques log_{10} du nombre d'UFC/mL.

3-2-1-2. J2 à J11 : traitement du biofilm

- **A J2 uniquement :** Les supports inox présentant un biofilm de 20h sont rincés par trempage dans 20 mL d'eau dure CEN (contenant des sels dissous notamment calcium et magnésium et préparé selon la norme Afnor (2010)).
- **De J2 à J11 (sauf le week-end): Traitement du biofilm avec le Galox Horizon:** 80 µL d'un mélange de SBE et d'eau dure CEN sont ajoutés sur chacun des supports et incubés à 20°C pendant 5h. Cette étape simule les conditions d'activité industrielle. Puis, chaque support inox est rincé individuellement dans 20 mL d'eau dure CEN immergé dans un puits d'une microplaque 6 puits contenant 4 mL de la solution biocide à la concentration à tester pendant 15 min, qui est le temps de contact du Galox Horizon sur le terrain. Les supports sont de nouveau rincés dans de l'eau dure CEN pour stopper l'action du biocide. Ils sont remis dans des boites de Pétri, elles-mêmes placées dans des boites carrées maintenues humides puis incubées à 20°C (température de l'atelier d'abattage) pendant 18h. Ce protocole de traitement des supports est répété tous les jours (sauf le weekend) pendant 8 fois.

3-2-1-3. A J2 et J11 : Dénombrement des bactéries survivantes.

A la fin du temps de contact avec le biocide, chaque support inox est mis en contact dans 10 mL d'une solution neutralisante NP2X pendant 5 min (temps de neutralisation du produit biocide), puis ils sont soumis aux ultrasons (Elma, 2min, 35kHz, 100%) afin de décrocher les bactéries du biofilm. Leur dénombrement, à partir des dilutions au $1/10^{ème}$ sur milieu GTS, constitue nos valeurs **T1** suite au premier traitement.

Afin de vérifier l'efficacité du décrochage des bactéries par les ultra-sons les supports inox sont rincés dans 20 mL d'eau dure CEN et ajoutés dans des tubes avec 10 mL de milieu liquide BTS pour être incubés à 37°C pendant 16 à 18h. L'absence de trouble bactérien après cette incubation permet d'attester que toutes les bactéries viables cultivables se sont décrochées. Cette procédure est répétée de la même façon après 8 traitements. Après neutralisation, 1 mL du mélange NP2X est ajouté à 9 mL de milieu BTS. Ce mélange est incubé à 37°C pendant 16 à 18h pour permettre aux bactéries stressées de se revivifier.

3-2-1-4. J3 et J11 : Conservation des bactéries récupérées.

Lors du dénombrement, les boites présentant un nombre d'Unités Formant Colonies inférieur à 8 et supérieur à 300 ne sont pas comptabilisées. A partir des tubes contenant une pousse bactérienne les suspensions sont centrifugées, le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans des cryotubes avec 2 mL de solution nutritive de conservation (SNC) pour stockage à -70°C avant les essais de CMI biocides et antibiotiques.

3-3. Caractérisation des souches bactériennes par PCR.

Afin de vérifier que les souches décrochées du biofilm sont des *E.coli*, une PCR spécifique *d'E.coli* en point final est réalisée. La taille du produit PCR est à comparer à celle générée par une souche de référence *E.coli* prise comme témoin.

Pour la préparation des échantillons de PCR, une colonie isolée sur gélose est remise en suspension dans du bouillon BMH et est soumise à un choc thermique pour casser la membrane cellulaire et libérer l'ADN par une incubation au bain marie à sec (95-100°C, 10 min) suivie d'un transfert dans la glace (10 min). La suspension est centrifugée (13 000 g, 3 min) et le surnageant contenant l'ADN sera utilisé pour la PCR. Les amorces utilisées issues du gène de l'ARN-16s sont spécifiques de l'espèce *E.coli* sont N°381 ($^{5'}$GCCGTATGCTTCGTCTTAAC$^{3'}$) et N°382 ($^{5'}$TCTTGCGTGGTATCTTCCG$^{3'}$). Les amplifications PCR sont réalisées dans un volume final de 50 µL contenant 1 µL de chaque amorce à 0.2 µM, 1 µL de dNTP à 0.20 mM, 4 µL de $MgCl_2$ à 2 mM et 0.25 µL de Tampon, Go*Taq* Flexi à 1.25U et 5 µL d'échantillon. Les conditions de PCR sont les suivantes : une dénaturation (95°C, 5 min), puis 30 cycles de dénaturation (95°C, 30s) une hybridation (55°C, 30s) une élongation (72°C, 30s) et une extension finale (72°C, 8min). Les amplifications sont réalisées dans un Thermocycleur VERITI (Applied Biosystems, Les Ulis, France). Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse pendant 1h30 sur gel d'agarose à 2% dans du tampon TAE (89 mM Tris, 89 mM Borate, 2 mM EDTA : Amresco) (1X) coloré avec le Gel Red (BioLabs) et lu sous lumière UV. Les images onst enregistrées avec le logiciel BIOCAPT (Vilber Lourmat, Torcy, France).

3-4. Détermination de la sensibilité *d'E.coli* aux biocides

La sensibilité *d'E.coli* aux biocides est déterminée selon une méthode de dilution en milieu liquide basée sur la CMI. A partir des solutions d'ammonium quaternaire (AQ) à 50%, des dilutions de désinfectant ont été préparées dans de l'eau dure CEN. Différentes gammes de concentrations ont été utilisées suivant la molécule étudiée : de 6 à 48 µg/mL pour le BC, de 0,75 à 6 µg/mL pour le CDDA et de 1 à 8 µg/mL pour le Galox Horizon. A partir des cryotubes, un isolement sur gélose au sang (37°C, 16 à 18h) est réalisé puis 2-3 colonies caractéristiques sont ensemencées dans du bouillon BMH (37°C, 16 à 18h). La DO de cette suspension bactérienne est ajustée à 0,1 et diluée au 1/100ème dans du bouillon BMH. Cette suspension est distribuée dans des microplaques de 96 puits contenant 20 µL de la gamme de concentration de chaque AQ. La souche de référence *E.coli* ATCC25922 fait office de témoin positif et une série de puits ne contenant pas d'AQ fait office de témoin contrôle de croissance. Les microplaques sont mises à incuber (37°C, 20 à 24h). La croissance des bactéries est évaluée par l'observation de la turbidité dans les puits. Les valeurs de CMI obtenues dans les essais ne sont valides que si les valeurs de la souche de référence sont conformes aux valeurs attendues.

3-5. Détermination de la sensibilité *d'E.coli* aux antibiotiques

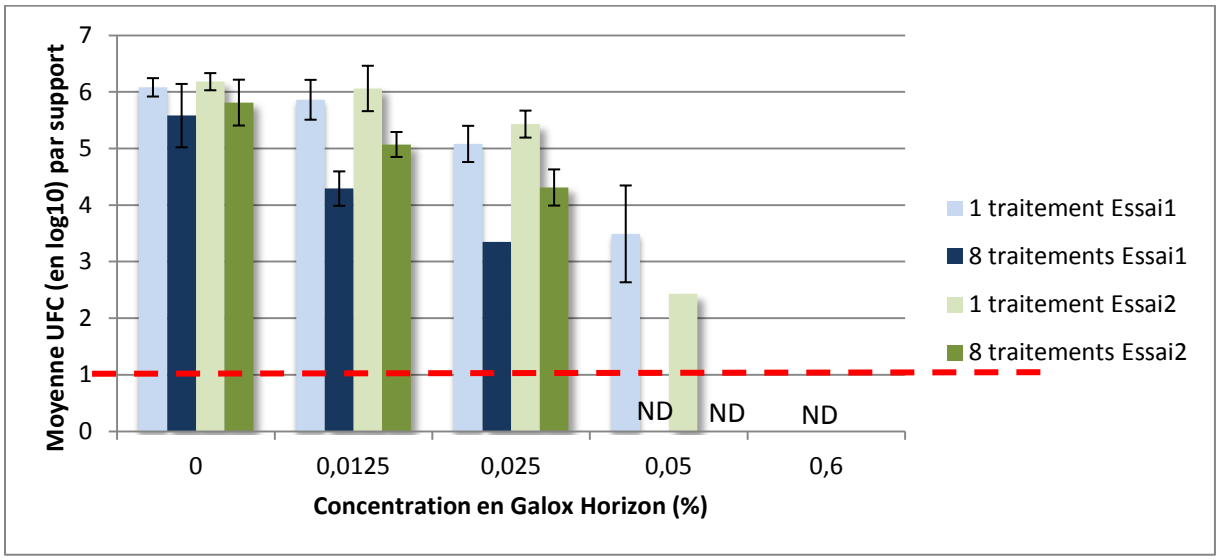
Les tests de détermination de la sensibilité *d'E.coli* aux antibiotiques ont été effectués par la méthode de microdilution en milieu liquide avec le système Sensititre™. Deux à 3 colonies caractéristiques préalablement isolées, à partir des cryotubes, sur milieu GTS au sang sont remises en suspension dans de l'eau déminéralisée stérile et cette suspension est ajustée à un standard MacFarland 0,5 par l'intermédiaire de l'AutoInoculator® Sensititre muni d'un néphélomètre. Cette suspension bactérienne (30 µL) à été diluée dans 11 mL de bouillon BMH (*inoculum* final) et 50 µL sont automatiquement distribués par l'AutoInoculator® Sensititre dans chaque puits des plaques contenant la gamme de concentrations en antibiotique (voir Annexe B). Un dénombrement est fait pour 1 souche de la série et la souche de référence *E.coli* ATCC25922 sur gélose au sang à partir de 55 µL l'*inoculum* final (incubation : 35°C, 16 à 18h). *E.coli* ATCC25922 est utilisée comme contrôle pour chaque test de sensibilité aux antibiotiques. La pureté de la culture est vérifiée par étalement de 1 µL

du puits contenant le témoin de croissance (voir Annexe C et D). La croissance apparait sous forme d'un trouble ou d'un dépôt de bactéries au fond du puits. La CMI est déterminée directement par le Vizion® et le résultat est transféré dans le logiciel SWIN (voir Annexe E). Les valeurs de CMI obtenues dans les essais ne sont valides que si les valeurs de la souche de référence *E.coli* ATCC25922 sont conformes aux valeurs attendues (Ampicilline : 2-8 µg/mL ;Cefotaxime : 0.,03-0,12 µg/mL ; Ceftazidime : 0.06-0.5 µg/mL ; Chloramphenicol : 2-8 µg/mL ; Ciprofloxacine : 0.004-0.015 µg/mL ; Colistine : 0.25-2 µg/mL ; Gentamicine : 0.25-1 µg/mL ; Meropénème : 0.008-0.06 µg/mL ; Acide Nalidixique : 1-4 µg/mL ; Tetracycline : 0.5-2 µg/mL ; Triméthoprime : 0.5-2 µg/mL).

RESULTATS – DISCUSSION

4-1. Survie *d'E.coli* cultivés en biofilms sur un support d'acier inoxydable.

Après formation d'un biofilm de 20h *d'E.coli* EC04 sur un support inox, celui-ci a été traité quotidiennement avec un produit biocide commercial composé d'un ammonium quaternaire (CDDA : chlorure de didecyldiméthyl ammonium) et de glutaraldéhyde : le Galox Horizon. Ce traitement a été répété 8 fois et différentes concentrations du biocide ont été testées. Un biofilm témoin a été également traité à l'eau dure CEN puisque celle-ci a été utilisée comme diluant pour faire les dilutions de Galox Horizon. Deux essais ont été réalisés dans ces mêmes conditions. Suite au 1er et 8ème traitement (T1 et T8) avec le Galox Horizon ainsi que pour le témoin, le nombre de bactéries décrochées du biofilm, survivantes et cultivables, a été déterminé. Les résultats sont reportés dans la figure 3.



Le trait pointillé rouge correspond au seuil de détection. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. ND : Valeurs non déterminées lors du dénombrement car en dessous du seuil de détection de la méthode.

Figure 3: Moyenne du nombre de bactéries survivantes (exprimée en $\log_{10}$) récoltées après 1 et 8 traitements par différentes concentrations de Galox Horizon des biofilms *E.coli* EC04. Deux essais sur 3 supports inox par essai ont été réalisés à des jours différents.

Globalement, malgré la variation biologique, la survie des bactéries récoltées à partir du biofilm ne diffère pas sensiblement entre les deux essais. Après 20 h d'incubation et un dépôt de 410^3 bactéries sur le support, la quantité maximale de bactéries est d'environ 10^6 UFC/support pour le biofilm témoin (en absence de biocide) ; cette quantité n'évolue pas au cours des traitements de T1 à T8. Cette même quantité est également notée pour le biofilm

après 1 traitement à la concentration de 0,0125%. Une diminution importante est observée après le 1er traitement à partir de 0.025% et en particulier à 0.05% avec 2.5-3.5 $\log_{10}$. Ces concentrations de biocides sont 12 à 24 fois plus faibles que la dose d'emploi. Pour une concentration donnée, le nombre de bactéries est 10 à 100 fois plus faible à T8 par rapport à T1.

Le Galox Horizon doit être utilisé sur le terrain à une dose de 0.6% selon les recommandations du fournisseur. Cette dose a été établie à partir d'essais d'évaluation de l'efficacité bactéricide par un test en suspension selon la norme EN1276 (Afnor,2010) ; ces essais sont exigés dans le cadre de la mise sur le marché des produits biocides. Sur le biofilm de *E coli* traité quotidiennement avec le biocide, cette concentration de 0.6% semble efficace (réduction de 5 $\log_{10}$) puisque le nombre de bactéries survivantes après T1 et T8 est inférieur au seuil de détection de la méthode (10 UFC/support). Pour permettre la multiplication éventuelle des quelques bactéries restées sur le support, le tube contenant le support après décrochage a été incubé pendant 24h. L'absence de trouble bactérien a permis de vérifier la destruction de toutes les bactéries et de confirmer l'efficacité du produit biocide (résultats non montrés). De la même façon pour les autres concentrations étudiées, les résultats obtenus (non montrés) à partir des tubes sont en accord avec les résultats de dénombrement : les boîtes de Pétri ayant des colonies présentent un trouble au niveau des tubes. Cependant, pour 2 échantillons, les résultats ne concordent pas : à 0.025% après T8 pour l'essai 1 et à 0.05% après T1 pour l'essai 2 les tubes ne présentent pas de pousse bactérienne pour les 3 supports tandis que des bactéries sont dénombrées sur gélose pour un des supports. Ceci peut s'expliquer par le fait que le neutralisant, qui est une solution initialement trouble, rend la lecture difficile lorsque les bactéries ne se sont que faiblement multipliées (léger trouble), ceci pouvant conduire à un résultat faussement négatif. N'ayant seulement qu'un résultat pour ces 2 échantillons, les écart-types n'ont pas pu être calculés et ne sont pas par conséquent représentés sur la figure 3.

Pour évaluer s'il existe des différences significatives entre les traitements T1 et T8 sur le nombre de bactéries survivantes entre les 2 essais, il aurait été nécessaire de réaliser une exploitation statistique des résultats. Il a été choisi de ne pas réaliser de tests statistiques car seulement 2 essais ont été réalisés avec 3 réplicats techniques (3 supports) par essai. Idéalement, un essai supplémentaire aurait été nécessaire.

Pour la suite des manipulations, quelques colonies ont été prélevées sur des boites de milieu qui présentaient des bactéries détachées des supports en inox et ceci pour différentes concentrations testées de Galox Horizon et après 1 et 8 traitements. Les résultats du dénombrement obtenu pour la concentration à 0,00625% de Galox Horizon étant quasi-similaires à ceux obtenus pour le témoin traité à l'eau dure CEN, ils n'ont pas été représentés dans la figure 3. Ces colonies ont été numérotées pour simplifier la présentation des résultats (tableau 1) et étudiées pour leur sensibilité aux biocides et aux antibiotiques.

Tableau 1: Numérotation des colonies *E coli* sélectionnées

	Concentration en Galox Horizon (%)	1 traitement	8 traitements
Essai 1	Témoin eau dure	1	4
	0,00625%	61-62-63	70-71-72
	0,0125%	64-65-66	73-74-75
Essai 2	Témoin eau dure	2-3	5-6
	0,0125%	67-68-69	76-77-78

4-2. Vérification de l'identité des bactéries

Lors d'essais précédents réalisés au cours de ce projet, il s'est avéré que les colonies isolées sur milieu non sélectif (GTS) pour une concentration donnée présentaient un phénotype modifié : colonies d'une taille plus petite. Ce résultat laissait suggérer qu'une contamination bactérienne, autre qu'*E.coli*, avait pu avoir lieu ou que le changement de morphologie était dû au stress représenté par le traitement quotidien par le Galox Horizon. Bridier *et al* (2011) ont également montré une modification de la morphologie des cellules de *Pseudomonas* après exposition à des doses sub-létales d'AQ. Les résultats négatifs que nous avons obtenus par une PCR spécifique d'*E.coli* sur ces colonies ont permis de confirmer l'hypothèse d'une contamination bactérienne. Ainsi, pour les essais réalisés dans le cadre de ce rapport, une PCR a été réalisée de manière systématique pour s'assurer de l'identité des bactéries récoltées à partir du biofilm. Un produit d'amplification de 96 pb est observé sur le profil électrophorétique pour chacune des colonies sélectionnées ainsi que pour la souche *E coli* de référence (figure 4). Il a été choisi également de faire un isolement sur un milieu sélectif McConkey qui donne des colonies de couleur rose pour *E.coli*, ce qui a été vérifié pour les colonies sélectionnées.

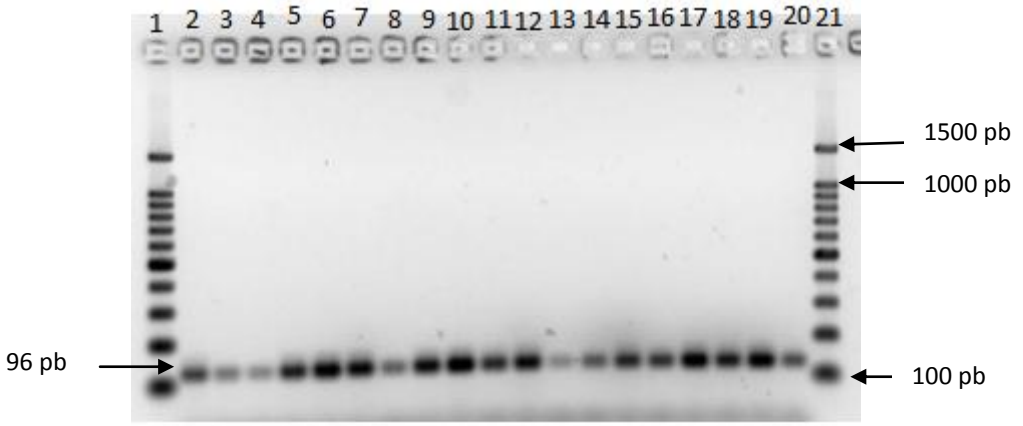


Figure 4: Produits d'amplification obtenus à partir des 18 colonies sélectionnées d'*E.coli* EC04 après 1 traitement (puits 3 à 11) et 8 traitements (puits 12 à 20) au Galox Horizon. Souche de référence *E.coli* ATCC25922 (puit 2). Marqueur de taille de 100 paires de bases (pb) (Promega) (puits 1 et 21).

4-3. Sensibilité *d'E.coli* aux biocides.

Les colonies de *E coli* (tableau 2) récoltées à partir des biofilms traités par le Galox Horizon (T1 et T8) ont été testées pour leur sensibilité vis-à-vis de 3 biocides (BC, CDDA et Galox Horizon). Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2: Concentrations minimales inhibitrices (µg/mL) des composés à base d'ammoniums quaternaires (BC, CDDA, Galox Horizon) pour les 18 colonies récoltées après 1 traitement (1T) et 8 traitements (8T) du biofilm *E.coli* EC04 et les 6 colonies issues des biofilms témoins.

	CMI BC (µg/mL)			CMI du CDDA (µg/mL)			CMI du Galox (µg/mL)		
Numéro E.coli EC04	à 1T	à 8T	Facteur d'augmentation	à 1T	à 8T	Facteur d'augmentation	à 1T	à 8T	Facteur d'augmentation
1/4	32	32	1	3	3	1	8	8	1
2/5	32	32	1	3	3	1	8	8	1
3/6	32	32	1	3	3	1	8	8	1
61/70	16	16	1	3	4	1,33	3	3	1
62/71	16	16	1	3	3	1	3	3	1
63/72	24	24	1	3	4	1,33	3	3	1
64/73	16	16	1	3	3	1	2	3	1,50
65/74	16	16	1	3	3	1	3	3	1
66/75	16	16	1	3	3	1	3	2	0,67
67/76	16	24	2	3	3	1	3	3	1
68/77	16	16	1	3	3	1	2	2	1
69/78	16	16	1	3	3	1	3	2	0,67
ATCC25922	**8**	**8**	1	**1,50**	**1,50**	1	**4**	**4**	1
Moyenne	16	16,80	**1,04**	2,88	3,04	**1,05**	4,08	4,00	**0,99**
SD	3,77	4,54	0,14	0,42	0,59	0,13	2,29	2,35	0,20

(SD : Standard deviation ; 1T : 1 traitement; 8T: 8 traitements).

Les souches après un 1er traitement (1T) présentent des sensibilités différentes selon la molécule d'AQ testée (tableau 2) : elles sont inhibées par des concentrations plus faibles de Galox Horizon (2 à 8 µg/mL soit une concentration en CDDA comprise entre 0.125 et 0.5 µg/mL), que de CDDA (1,5 à 4 µg/mL) ou de BC (8 à 32 µg/mL). La concentration de CDDA trouvée dans le Galox Horizon est plus faible que celle du CDDA seul car elle est associée à celle d'une autre substance active, le glutaraldéhyde.

Globalement, les 24 colonies *E.coli* EC04 analysées ne présentent pas d'augmentation de la CMI vis-à-vis de chacun des biocides (tableau 2) entre T1 et T8. Cependant, quelques colonies présentent une CMI augmentée d'un facteur 1.33 à 1.5 mais celui-ci ne dépasse jamais la valeur de 2, valeur minimale qui est généralement jugée comme significative pour pouvoir considérer que la bactérie s'est adaptée.

En d'autres termes, la sensibilité de *E coli* au biocide n'a pas évolué avec la durée du traitement au Galox Horizon : les valeurs de CMI pour un biocide donné à T8 sont identiques

à celles à T1. Les facteurs d'augmentation entre T1 et T8 étant inférieurs à 2, on ne peut pas dire que *E.coli* s'est adapté au traitement biocide. Ces résultats sont en contradiction avec ceux trouvés par Soumet *et al*. (2012). En effet,ces auteurs ont montré que des bactéries *E coli* cultivées en présence de concentrations croissantes subinhibitrices en biocides (BC, CDDA et au Chlorure de dioctyl diméthyl ammonium) pendant 7 passages présentaient une augmentation de la CMI d'un facteur environ 3 à ces biocides. Les différences peuvent s'expliquer par le fait que les essais étaient réalisés en suspension et avec des substances actives au lieu d'une formulation commerciale (Galox Horizon).

Cependant, les valeurs de CMI trouvées pour nos témoins traités à l'eau dure concordent avec ceux des témoins dans les travaux de Soumet *et al*. (2012) : CMI pour le BC varie de 16 à 32 µg/mL et 1,5 à 3 µg/mL pour le CDDA. Il y a bien un effet du Galox Horizon noté sur le biofilm traité par rapport au biofilm témoin : mais contrairement à ce qui était attendu, la CMI du BC et celle du Galox Horizon sont diminuées de moitié (on passe de 32 à 16 µg/ml pour le BC et de 8 à 3 µg/mL pour le Galox Horizon). Aucun n'effet n'est visible pour le CDDA. En effet, on pensait qu'il aurait fallu une concentration plus élevée pour inhiber les bactéries puisqu'il est admis que les bactéries sous forme de biofilm possèdent un phénotype particulier et sont plus résistantes à leur environnement par rapport aux bactéries en suspension (Tyerman *et al.*, 2013). Or, il n'y a pas eu de diminution de la sensibilité aux biocides et les valeurs de CMI sont inférieures à celles trouvées dans la tâche 2 du projet. Ceci peut s'expliquer par le fait que les bactéries ont été décrochées des supports et recultivées, et qu'elles auraient pu perdre leur phénotype.

Ainsi, notre étude comparant l'effet d'une exposition répétée au biocide : le Galox Horizon sur la sensibilité aux AQ pour notre souche d'*E.coli* montre que l'exposition répétée pendant 8 traitements au Galox Horizon n'influence pas l'adaptation aux 3 AQ (BC, CDDA et Galox Horizon). Tandis que Langsrud *et al* ont trouvé une sensibilité diminué d'un facteur de 3 *d'E.coli* au BC bien que ces essais aient été réalisés sur une période plus longue (24 passages).

4-4. Sensibilité *d'E.coli* aux antibiotiques

De la même façon que pour les biocides, la mesure des concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques a été déterminée pour évaluer la sensibilité sur ces 18 mêmes colonies d'*E coli* après un 1er traitement et un 8ème traitement au Galox Horizon (figure 5).

Les contrôles de pureté des *inocula* utilisés pour ensemencer les microplaques pour les essais de CMI ainsi que ceux de pureté de la souche bactérienne sont conformes aux résultats attendus. Les valeurs de CMI antibiotiques pour la souche de référence *E.coli* ATCC25922 sont conformes aux valeurs attendues (cf. Matériels et Méthodes partie 3-5) permettant de valider les résultats de CMI antibiotiques pour les colonies *d'E.coli* testées.

Tableau 3: Concentrations minimales inhibitrices (µg/mL) des antibiotiques avec leur seuil épidémiologique pour les colonies récoltées après 1 traitement (1T) et 8 traitements (8T) du biofilm *E.coli* EC04 et les résultats issus de la tâche précédente pour *E coli* non adaptée.

Antibiotique	CMI (µg/mL) pour *E.coli* EC04			Seuil épidémiologique WT ≤ (µg/mL)
	Non adaptée	Témoin eau dure (n=6) T1 (colonies 1 à 3)/ T8 (colonies 4 à 6)	Galox Horizon (n=18) T1 (colonies 61 à 69) / T8 (colonies 70 à 78)	
Ampicilline	4	8/8	8/8	≤ 8
Cefotaxime	0,06	0,12/0,12	0,12/0,06-0,12	≤0,25
Ceftazidime	0,12	0,25-0,5/0,25-0,5	0,25-0,5/0,25-0,5	≤0,5
Chloramphenicol	8	8-16/16	16/8-16	≤ 16
Ciprofloxacine	0,015	0,015-0,03/0,015-0,03	0,015-0,03/0,015-0,03	≤0,03
Colistine	≤0,5	1/1	1-2/1-2	≤2
Gentamicine	1	1/1-2	1-2/1-2	≤2
Meropenem	≤0,12	≤0,12/≤0,12	≤0,12/≤0,12	≤ 0,125
Acide Nalidixique	4	4/4	4/4	≤ 16
Streptomycine	128	128/128	128-256/128	≤16
Sulphamethoxazole	16	16/16	16/16-32	≤ 256
Tetracycline	128	128/128	128- >128/128- >128	≤ 8
Trimethoprime	0,5	1/0,5-1	1-2/1	≤2

Seuils épidémiologiques séparant pour chaque couple bactérie-antibiotique, la population des souches sauvages, (WT "wild type"), de celles porteuses d'un ou plusieurs mécanismes de résistance acquise. Les lignes surlignées en rouge représentent les antibiotiques pour lesquels *E.coli* est résistante.

A partir de l'analyse du profil de résistance (tableau 3), nous notons aucune modification des valeurs de CMI des colonies *E coli* recoltées à partir des biofilms traités avec le Galox Horizon par rapport à celles des colonies *E coli* du témoin traité à l'eau dure, au lieu du biocide. De même, les valeurs de CMI ne diffèrent pas entre le 1er et le 8ème traitement que ce soit pour le témoin et traité au Galox Horizon. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas d'impact du Galox Horizon sur la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Par contre, on note une légère différence (d'un facteur 2 au plus) entre les valeurs de CMI pour la plupart des antibiotiques de la souche non adaptée déterminées au cours de la tâche 2 du projet

DABESBIO et nos valeurs de CMI pour le témoin traité à l'eau dure, au 1er et au 8ème traitement. Au cours de cette tâche 2, les bactéries avaient été exposées par repiquages successifs dans un test en suspension à des concentrations croissantes en CDDA. Pour évaluer leur capacité d'adaptation, leurs valeurs de CMI des antibiotiques avaient été déterminées avant l'exposition (non adaptée) et après l'exposition (adaptée) avec le CDDA. Les résultats ont montré que la bactérie *E.coli* EC04 non adaptée au biocide était résistante à la Streptomycine (STR) et à la Tétracycline (TET) et suite à l'adaptation au CDDA son profil de résistance aux antibiotiques n'avait pas été modifié (résultats non montrés) On constate que les valeurs de CMI de la STR et la TET dépassent fortement celles du seuil épidémiologique (tableau 3).

En résumé, le traitement au Galox Horizon appliqué sur les biofilms n'a pas conduit à une modification du profil de résistance aux antibiotiques de *E.coli*. Ces résultats sont cohérents avec ceux qui avaient été trouvés au cours de la tâche 2 du projet. Les conditions expérimentales étaient pourtant très différentes : la souche bactérienne avait été exposée au CDDA et dans un test en suspension. Dans une autre étude, Soumet *et al* avaient montré que la majorité des souches *E.coli* étudiées avaient acquis des résistances supplémentaires aux antibiotiques suite à un traitement au CDDA. Elles étaient devenues multi-résistantes à AMP, FOT, TAZ, CHL, CIP, NAL, STR, SMX, TET et TMP.

Ainsi, aucune résistance croisée entre biocides et antibiotiques n'a pu être trouvée au cours de notre étude. Des résultats controversés sont trouvés dans la littérature : *E.coli* sérotype O157 H7 traité au BC montre une diminution de sensibilité aux antibiotiques CHL, TMP, TET AMP (Braoudaki *et al*., 2004) alors qu'aucune modification de la sensibilité aux antibioques est observée pour différents sérotypes de *Salmonella* suite à l'exposition à des concentrations subinhibitrices de biocide (Condell *et al*., 2012). Ces différences peuvent s'expliquer par l'étude d'espèces bactériennes différentes, de biocides différents (substances actives ou formulations) et de méthodes d'étude différentes.

CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

L'utilisation massive et inappropriée des biocides en production animale est sujet à controverse car elle pourrait contribuer à la sélection de bactéries moins sensibles à ces biocides voire à des antibiotiques du fait de la capacité d'adaptation développée par des bactéries, en particulier lorsque celles-ci sont en contact avec des concentrations sub-létales de biocide. Dans ce contexte, nous avons testé l'effet de traitements répétés par de faibles concentrations d'un produit biocide commercial (Galox Horizon) sur une souche *d'Escherichia Coli* (EC04) cultivée en biofilm sur un coupon en inox. Différents paramètres (charge en matières fécales, température, tempsde contact du biocide) ont été pris en compte pour simuler les conditions terrain rencontrées en abattoir de porcs. Nos résultats montrent aucune diminution de la sensibilité de la souche vis-à-vis de 3 biocides : BC, CDDA et Galox Horizon. Il en va de même pour la sensibilité aux antibiotiques qui n'est pas diminuée. Sachant que notre étude s'est limitée à une souche, des études supplémentaires sur d'autres souches bactériennes *d'E coli* pourraient être envisagées pour confirmer ou non ces résultats.
Lors de la tâche 2du projet, la sensibilité *d'E.coli* aux antibiotiques avait été déterminée suite à des expositions en suspension au CDDA. Il pourrait être intéressant de réitérer cette manipulation en exposant *E.coli* au Galox Horizon. Si des résultats identiques sont observés pour les tests en suspension et en biofilm, les tests en suspension plus faciles à mettre en œuvre, pourraient ête utilisés pour prédire le comportement vis-à-vis d'antibiotiques de *E coli* en biofilms traités par des concentrations sublétales de biocides. De plus, les biofilms rencontrés en condition terrain peuvent être monomicrobien comme dans notre étude, mais également bimicrobien, il pourrait alors être envisagé ces expériences sur un biofilm bimicrobien.

BILAN PERSONNEL

Ces 10 semaines de stage m'ont apporté une nouvelle expérience professionnelle très enrichissante. J'ai pu mettre en pratique les notions apprises lors de ma formation et j'ai acquis de nouvelles connaissances et compétences en microbiologie. Les bases d'hygiène et de sécurité pour le travail en laboratoire de microbiologie me sont maintenant familières. Ce stage a également été formateur au niveau de la réflexion et de l'interprétation des résultats. Après quelques semaines de formation, j'ai pu organiser et réaliser mes manipulations en autonomie. Cette expérience plaisante m'a apporté de l'assurance sur mes capacités de travail.

J'ai également été immergé lors de ce stage dans le monde du travail. Il est agréable de travailler à l'ANSES de Fougères dans un laboratoire qui dispose d'installations et de matériels scientifiques récents. Le projet sur lequel j'ai travaillé était particulièrement intéressant et m'a permis de conforter mon choix de parcours et de projet professionnel.

En plus des bénéfices qu'a pu m'apporter ce stage, l'ambiance au sein du laboratoire a été agréable et joviale. J'ai très rapidement été intégrée et j'ai pu participer aux activités transversales organisées par le laboratoire. L'ensemble du personnel était très disponible et j'ai obtenu de l'aide ou une réponse à chaque problème que j'ai rencontré et à chaque question que je me suis posée.

BIBLIOGRAPHIE

1. AASE, B., SUNDHEIM, G., LANGSRUD, S. and RORVIK, L.M. (2000) Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology** 62, 57-63.
2. Afnor (2010) - NF EN 1276 – Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide des antiseptiques et des désinfectants chimiques, utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie dans les domaines domestiques et en collectivité – Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1).
3. BRAOUDAKI, M. and HILTON, A.C. (2004) Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology** 42, 73-78.
4. BRIDIER. A, BRIANDET. R, THOMAS. V & DUBOIS-BRISSONNET. F- (2011): Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review, **Biofouling,** 27:9, 1017-1032.
5. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) Opinion on: Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. Adopted by the SCENIHR during the 28th plenary meeting of 19 January 2009 – Commission Européenne. Disponible sur http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/opinions/scenihr_opinions_en.htm#1 (consulté le 30/04/15).
6. CAPITA C., RIESCO-PELAEZ F., ALONSO-HERNANDO A., ALONSO-CALLEJA C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to Sublethal concentrations of food-grade biocide influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobial, and ultrastructure. **Applied and Environmental Microbiology** 4(80): 1268-1280.
7. CONDELL, O., IVERSEN, C., COONEY, S., POWER, K.A., WALSH, C., BURGESS, C., FANNING, S., (2012).Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*,and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobialcompounds**. Applied and Environmental Microbiology** 78, 3087–3097.
8. DAVISON, H. C., J. C. LOW, WOOLHOUSE M-E.J,.. (2000). What is antibiotic resistance and how can we measure it. **Trends Microbiol** 8(12): 554-9.

9. HEIR, E., SUNDHEIM, G. and HOLCK, A.L. (1995) Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp isolated from the food industry and nucleotide sequence of resistance plasmid pST 827. **Journal of Applied Bacteriology** 79, 149-156.
10. Institut de veille sanitaire (InVS) et Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) (2014). Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable. Bilan des données de surveillance, 18 novembre 2014. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire ; 10 p. Disponible à partir de l'URL : http://www.invs.sante.fr (consulté le 20/04/15)
11. LANGSRUD, S., SUNDHEIM, G., HOLCK, A.L., (2004). Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers. **Journal of Applied Microbiol**ogy 96, 201–208.
12. McMAHON, M. A. S., J. Xu, MOORE J-E., BLAIR I-S.,McDOWELL D-A.,. (2007). Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. **Applied and Environmental Microbiology** 73(1): 211-217
13. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité, et de l'aménagement du territoire. (2011). Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire. 32 pages.
14. MORTUREUX M., RUAUX N. (2013). Les résistances aux insecticides, antiparasitaires, antibiotiques…Comprendre où en est la recherche. Les cahiers de la recherche : Santé, Environnement, Travail. ANSES. 80 pages. Disponible sur https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/CDLR-mg-Antibioresistance3.pdf. (consulté le 30/04/15).
15. PEYRAT M-B. (2008) Etude de l'influence du nettoyage et de la désinfection et des procédés d'abattage en abattoir de volailles sur le niveau de résistance aux antibiotiques des campylobacters. Thèse de doctorat d'Université. Rennes : Université de Rennes 1., 238 pages. Disponible en ligne : https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00288961 (consulté le 21/04/15)
16. RUSSELL, A. D. (2002). Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy** 49(4): 597-9.
17. SOUMET C., FOURREAU E., LEGRANDOIS P., MARIS P. (2012) Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia Coli*. **Veterinary Microbiology** 158 147-152.

18. TYERMAN J-G.,PONCIANO J-M.,JOYCE P.,FORNEY L-J.,HARMON L-J., (2013) The evolution of antibiotic susceptibility and resistance durinf formation of *Escherichia Coli* biofilms in the absence of antibiotics. **BMC Evolutionary Biology**, 13:22.

ANNEXE A

Préparation des matières fécales :

- remise en suspension de 25 g de matières fécales dans 150 ml (dilution au 1/6ème) d'eau stérile
- Mise en sacs stomacher de 63 µm pour éliminer les grosses particules- Centrifugation 3000 g 5 min -
- Filtration sur 0,45 µm (stericup Millipore) récupération de 60 ml
- Filtration sur 0,22µm (systèmes stericup 0,22)

Préparation des supports inox : étape de nettoyage :

1.4 - Préparation des supports solides non poreux

Préalablement aux essais de biocontamination, les supports sont découpés en échantillons de taille connue.

14.1 - *Protocole de nettoyage.*

Pour préserver les propriétés initiales des matériaux, une procédure de nettoyage standardisée devra être utilisée. Cette procédure pourra être la suivante :

- immersion dans une solution de RBS35® (action détergente et désinfectante, Chemical Products R. Borghgraef s.a, Bruxel) à 2% v/v dans de l'eau à 50°C ultrapure ou distillée sous agitation douce pendant 10 min,
- 5 rinçages de 5 min chacun avec de l'eau ultra pure ou distillée à 50°C,
- 5 rinçages de 5 min chacun avec de l'eau ultra pure ou distillée à température ambiante.

Pour les échantillons d'acier inoxydable, une étape préliminaire de dégraissage doit être réalisée avec un mélange acétone/éthanol à 50% v/v. Cette opération doit être réalisée par frottage au moyen d'une lingette non abrasive et non plucheuse.

Remarque : Les échantillons devront être utilisés immédiatement après nettoyage (sans étape d'autoclavage), voire stockés dans un récipient stérile contenant de l'eau ultra pure stérile jusqu'à utilisation finale (ne pas dépasser 24 heures).



Une fois nettoyés, les échantillons devront être manipulés avec précautions pour éviter tout risque de recontamination (et de modification des propriétés de surface des échantillons à analyser).

- Manipuler les échantillons à l'aide de pinces propres et proscrire les manipulations avec les doigts.
- Proscrire toute inscription sur l'une ou l'autre des faces à analyser à l'aide de feutres, stylos ou marqueurs (préférer le gravage sur la face opposée à celle d'étude)
- Proscrire colles, scotchs… pour fixation des échantillons (préférer la fixation par « pinces » ou tout autre système mécanique)

ANNEXE B

Schéma expérimental d'une microplaque pré-remplie et gammes de concentrations d'antibiotiques testés pour les essais de CMI antibiotiques :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**AMP**	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	AMP	**AMP**	**CHL**	**GEN**	**NAL**	**STR**
	1	2	4	8	16	32	64	128	4	0.5	2	4
B	**FOT**	FOT	FOT	FOT	FOT	FOT	FOT	FOT	CHL	GEN	NAL	STR
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	1	4	8
C	**TAZ**	TAZ	TAZ	TAZ	TAZ	TAZ	TAZ	TAZ	CHL	GEN	NAL	STR
	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	2	8	16
D	**SMX**	SMX	SMX	SMX	SMX	SMX	SMX	SMX	CHL	GEN	NAL	STR
	8	16	32	64	128	256	512	1024	32	4	16	32
E	**TET**	TET	TET	TET	TET	TET	TET	TET	CHL	GEN	NAL	STR
	1	2	4	8	16	32	64	128	64	8	32	64
F	**TMP**	TMP	TMP	TMP	TMP	TMP	TMP	TMP	CHL	GEN	NAL	STR
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	128	16	64	128
G	**COL**	COL	COL	COL	COL	COL	**MERO**	MERO	CHL	GEN	NAL	STR
	0.5	1	2	4	8	16	0.12	0.25	256	32	128	256
H	**CIP**	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	**POS**
	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	**CON**

Code	Antibiotique	Gamme testée (µg/ml)
NAL	Acide Nalidixique	2 - 128
AMP	Ampicilline	1 - 128
FOT	Céfotaxime	0.03 - 4
TAZ	Ceftazidime	0.06-8
CHL	Chloramphénicol	4 – 256
CIP	Ciprofloxacine	0.008 - 8
COL	Colistine	0.5 - 16
GEN	Gentamicine	0.5 - 32
MERO	Méropénème	0.12 - 0.25
STR	Streptomycine	4 - 256
SMX	Sulfaméthoxazole	8 – 1024
TET	Tétracycline	1 - 128
TMP	Triméthoprime	0.25 - 32
POS CON	*Positive Control*	

ANNEXE C

Mode opératoire de la détermination de la CMI des antibiotiques en milieu liquide :

anses
Laboratoire de Fougères

Détermination des CMI en milieu liquide : méthode Sensititre
(F/MICRO/RST/PTC/001)

MODE OPERATOIRE

Date	20/05/15	Code Projet	11.DC	N° de la DA	

AJUSTEMENT DE L'INOCULUM

*Inoculer **5** ml d'eau déminéralisée avec au moins **3 à 5 colonies**, vortexer et ajuster la suspension au standard Mc farland à l'aide du néphélomètre Sensititre®.*

Eau déminéralisée stérile	N° de lot	603079	Date de péremption	09/12/2016
Solution de Mc Farland 0,5	N° de lot	C475010	Date de péremption	09/2015

INOCULUM FINAL A 1.10⁵ UFC/ML

*Transférer stérilement **30 µl** de l'inoculum standardisé dans **11** ml de BMH et mélanger au vortex.*

☐ PSM I-F-11-0946	☒ PSM I-F-11-0904	☐ Autre PSM :		
☐ Micropipette I-F-11-0932	☐ Micropipette I-F-11-0938	☐ Micropipette I-F-11-0939	☒ Micropipette I-F-14-0030	☐ Autre micropipette :

BMH	N° de lot	594288	Date de péremption	24/11/2015

DISTRIBUTION DANS LES MICROPLAQUES

Type et n° de lot des microplaques Sensititre	☐ LOT 83361A CODE MODÈLE 2015  FRMAFS8 ☐ EUVSEC2 ☐ Autre : custom lot: 83361A
N° de lot des Dosing Head	H6015

☐ Autoinoculateur I-F-11-0953	☒ Autoinoculateur I-F-11-0927	☐ Autre Autoinoculateur :

INCUBATION [35 ± 1°C, 18-24 HEURES (24 h pour *Enterococcus* spp.)]

☒ Etuve I-F-11-0951	☐ Autre étuve :

Heure(s) d'entrée dans l'étuve	Heure(s) de sortie de l'étuve
10H44	10H36.

Remarques	*Signature de l'analyste*

ANNEXE D

Fiche d'enregistrement de la pureté et du dénombrement des colonies viables et cultivables.

anses
Laboratoire de Fougères

Détermination des CMI en milieu liquide : méthode Sensititre
(F/MICRO/RST/PTC/001)

PURETE ET DENOMBREMENTS DES COLONIES VIABLES

Date	20/05/15	Code Projet	M.SC.	N° de la DA	

VERIFICATION DE LA PURETE DES INOCULUMS FINAUX

*Plonger une **anse de 1 µl** dans la cupule témoin et faire des stries sur une gélose au sang.*

GTS au sang de mouton à 5 %	N° de lot / Date de fabrication	Date de péremption / Coulé le

Incubation [35 ± 1°C, 16-24 HEURES]

☒ Etuve I-F-11-0951 ☐ Autre étuve :

RESULTATS (noter en cas de culture mixte ou toute anomalie)

DENOMBREMENT DES BACTERIES VIABLES [1 A 4 SOUCHES PAR SERIE]

☐ PSM I-F-11-0946 ☒ PSM I-F-11-0904 ☐ Autre PSM :

*Prélever **55 µl** dans le tube d'inoculum restant et les diluer dans **11 ml** de BMH (dilution au 1/200). Après agitation, étaler au râteau **100 µl** de cette dilution à la surface de 2 géloses préalablement séchées.*

☒ Micropipette I-F-11-0932	☐ Micropipette I-F-11-0938	☐ Micropipette I-F-11-0939	☐ Micropipette I-F-14-0030	☐ Autre micropipette :

BMH	N° de lot	594288	Date de péremption	24/11/2015

GTS au sang de mouton à 5 % — Noter si différent des références ci-dessus

Incubation [35 ± 1°C, 16-24 HEURES]

☒ Etuve I-F-11-0951 ☐ Autre étuve :

RESULTATS [CONFORME SI 25 à 250 colonies dénombrées SOIT 5. 10^4 UFC/ml à 5.10^5 UFC/ml]

Compteur de colonies : ☐ I-F-11-0908 ☐ I-F-11-0909 ☒ I-F-11-0943 ☐ I-F-11-1245 ☐ Comptage manuel

N° de souche	Nombre de colonies : 1ère boîte	Nombre de colonies : 2ème boîte	Dénombrement (moyenne x 2000)	Conformité
ATCC	147	149	2,66.10^5	OK
78	64	50	1,14.10^5	OK

Remarques	*Signature de l'analyste*

F/MICRO/RST/FE/264 - Version 3
Date d'application : 07/04/2015

Page : 1 /1
Ref. Intraqual Doc : D_4912.doc

ANNEXE E

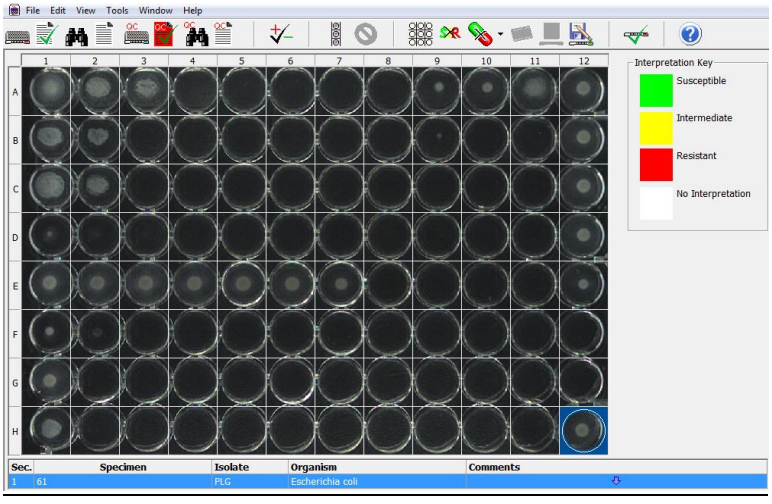
Exemple d'une feuille de résultat et d'une plaque de CMI antibiotiques visualisée avec le logiciel SWIN :

ANSES Laboratoire
Bâtiment Bioagropolis
10B rue Claude Bourgelat
CS 40608 - Javené
35306 FOUGERES cedex
FRANCE
tel. 02.99.17.27.47
fax 02.99.94.78.80

Detailed Multi Plate Report

Patient ID	: DABESBIO
Specimen	: 61
Specimen Date/Time	: 21/05/2015 09:05:38
Source	: Faeces
Isolate	: PLG
Organism	: Escherichia coli

Antimicrobic	RMAFS8 Manual Read 24 Hour Incubation Period 21/05/2015 14:09:05	
Ampicilline	8	NI
Cefotaxime	0,12	NI
Ceftazidime	0,25	NI
Chloramphenicol	16	NI
Ciprofloxacin	0,015	NI
Colistin	1	NI
Gentamicin	1	NI
Meropenem	0,25	NI
Nalidixic Acid	4	NI
Streptomycin	128	NI
Sulphamethoxazole	16	NI
Tetracycline	128	NI
Trimethoprim	1	NI



RESUME/ABSTRACT

L'impact de l'usage d'un biocide désinfectant (Galox Horizon : formulation à base de Chlorure de Didécyl Diméthyl Ammonium (CDDA) et de glutaraldéhyde) utilisé en abattoirs de porcs sur l'évolution de la sensibilité à des biocides et à des antibiotiques a été étudié. Une souche *d'Escherichia Coli* (EC04) a été cultivée en biofilms sur des coupons d'acier inoxydable pendant 20 h puis exposée quotidiennement à des concentrations sub-létales de Galox Horizon pendant 8 traitements ; un biofilm témoin a été traité en utilisant de l'eau dure. Suite aux 1er et 8ème traitement, les bactéries ont été détachées du support, dénombrées et leur sensibilité à 3 composés d'ammoniums quaternaires (AQ) [CCDA, Chlorure de Benzalkonium (BC), Galox Horizon], et à une large gamme d'antibiotiques a été déterminée par une méthode basée sur la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Aucune diminution significative de la CMI vis-à-vis des 3 biocides pour la souche *Ecoli* (EC04) ayant subi un traitement n'a été observée par rapport à celle du biofilm témoin (non traité par le Galox Horizon). De même, la sensibilité aux antibiotiques de *E coli* a très peu évolué (augmentation au plus d'un facteur 2) entre le biofilm traité et non traité. Dans nos conditions expérimentales, aucune résistance croisée entre les AQ et les antibiotiques chez la souche *E.coli EC04* cultivée en biofilms n'a été démontrée.

The effect to use a disinfectant biocide (Galox Horizon) combining didecyl dimethyl ammonium chloride (CDDA) and glutaraldéhyde used in pork industry on the susceptibility to biocides and antibiotics was studied. *Escherichia coli* was cultivated in biofilm on stainless steel coupons during 20 h and daily exposed to subletal concentrations of Galox Horizon during 8 treatments ; biofilm control was treated with hard water. After 1 and 8 treatment, bacteria were detached from stainless steel, counted and their susceptibility to 3 Quaternary Ammonium Compounds (QAC) [CDDA, Benzalkonium chloride (BC), Galox Horizon], and to a range of antibiotics were determined by a minimum inhibitory concentration (MIC) based method. No significant decrease in MIC to 3 QAC for *E.coli* having undergone one treatment was observed in comparison to biofilm control. The susceptibily to antibiotics in *E coli* is not also modified (increase in most than twice) when biofilm treated with biocide is compared to that not treated. No cross-resistance was observed between QAC and antibiotics in *E.coli* cultived in biofilm.

Mots clés/key words : *Escherichia Coli*, biofilms, composés d'ammoniums quaternaires, antibiotiques, résistance croisée. *Escherichia Coli*, biofilms, quaternary ammonium compounds, antibiotics, cross-resistance.