

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Évaluation de la résistance des biocides antimicrobiens

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective révisé

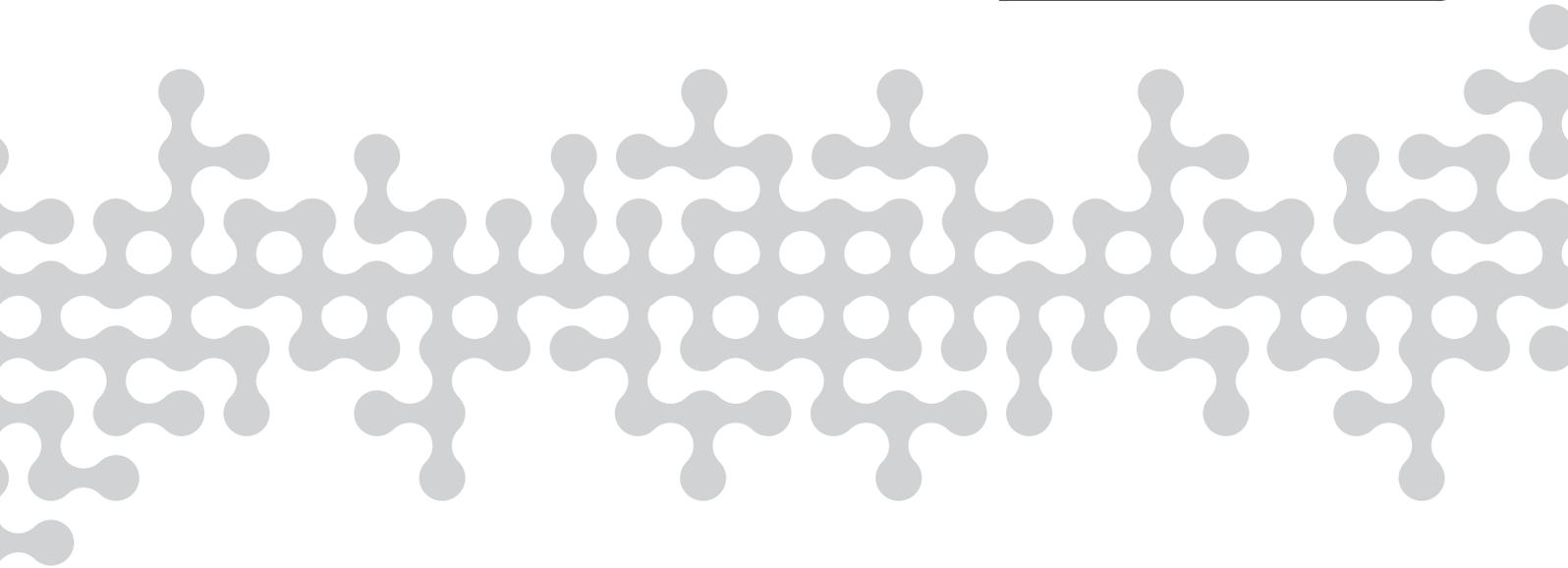
Juin 2020 - Édition scientifique



Évaluation de la résistance des biocides antimicrobiens

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective révisé

Jun 2020 - Édition scientifique



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 7 novembre 2018

AVIS **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

relatif à la « Résistance aux biocides antimicrobiens »

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses s'est saisie le 9 novembre 2016 pour la réalisation de l'expertise suivante : Auto-saisine relative à la résistance bactérienne aux biocides antimicrobiens.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le Règlement européen n°528/2012 du 22 mai 2012, en application depuis le 1er septembre 2013, régit la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides, visant à améliorer la libre circulation des produits biocides dans l'Union Européenne tout en garantissant un niveau élevé de protection de la santé humaine et animale et de l'environnement. Dans le cadre de ce règlement, il est nécessaire de s'assurer que chaque produit biocide mis sur le marché est efficace contre les organismes cibles revendiqués, n'induit pas d'effet inacceptable sur l'homme et sur les organismes non cibles, mais également qu'il n'induit pas d'effet inacceptable sur les organismes cibles, en particulier une résistance ou une résistance croisée.

Il n'existe pas aujourd'hui de lignes directrices relatives à l'évaluation des effets inacceptables telle que la résistance. Il s'avère donc nécessaire de proposer une démarche d'évaluation de ce phénomène de résistance afin d'aider, autant les autorités compétentes que les industriels, à répondre aux exigences définies en différents points du règlement biocide.

L'Anses s'est donc saisie du sujet le 9 novembre 2016 afin de proposer des méthodes d'évaluation de l'apparition d'un phénomène de résistance/résistance croisée, c'est-à-dire l'évaluation de la capacité, du niveau et du maintien d'une résistance pouvant être développés par les bactéries suite à une exposition aux substances et produits biocides. Des stratégies de gestion de la résistance seront également proposées le cas échéant.

Cette auto-saisine cible uniquement les biocides antimicrobiens à action antibactérienne, utilisés dans de très nombreux domaines, notamment celui de l'hygiène humaine, de l'élevage, de l'industrie, des eaux, aussi bien en tant que produits désinfectants que produits de protection (conservateurs).

Cette autosaisine n'aborde pas le sujet du développement de la résistance bactérienne aux antibactériens dans l'environnement, liée aux rejets de résidus de produits biocides dans l'environnement. Au sein du département de l'évaluation des risques de l'Anses, une saisine gérée par l'unité « Evaluation des risques liés à l'eau », et traitant de l'antibiorésistance dans l'environnement aborde ce sujet.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail (GT) « Résistance aux biocides antimicrobiens », rattaché au comité d'experts spécialisé « Substances et Produits biocides ». Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Le groupe de travail s'est réuni 9 fois entre le 1^{er} mars 2017 et le 24 mai 2019. Les travaux ont fait l'objet d'un rapport, dont le présent avis reprend les principales conclusions.

Les travaux ont été présentés au CES pour discussion, tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques les 21 février 2019 et 28 mars 2019. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Les travaux du GT ont été adoptés par le CES lors de sa séance du 20 juin 2019.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSION DU CES ET DU GT

En préambule de la construction d'une démarche d'évaluation d'un phénomène de résistance, une synthèse bibliographique a été réalisée par l'Anses sur :

- Les différentes définitions liées à ces phénomènes de résistance ;
- Les principaux modes d'action des biocides, et les mécanismes de résistances impliqués chez les bactéries ;
- Les approches méthodologiques existantes permettant d'évaluer l'aptitude des bactéries à développer une résistance.

Une démarche d'évaluation d'un phénomène de résistance applicable aux produits ou substances actives biocides est ensuite proposée. Au travers d'un protocole expérimental, divers choix méthodologiques seront faits en cohérence avec les usages et conditions d'application des biocides antibactériens. Ces choix seront intégrés dans un arbre décisionnel permettant *in fine* d'apprécier le risque de développement de résistance, voire de résistances croisées à d'autres biocides antibactériens ou antibiotiques. Le cas échéant, des stratégies de gestion de l'apparition de la résistance seront ensuite proposées.

3.1. Synthèse bibliographique

3.1.1. - Définitions

L'analyse bibliographique sur le thème de la résistance des micro-organismes aux biocides antibactériens a conduit au constat que des divergences fortes apparaissent entre les auteurs dans les termes utilisés (résistance, tolérance, sensibilité réduite, résistance croisée, co-résistance, résistance acquise, résistance et biofilm, ...).

Dans le cadre de ce travail, le GT propose de ne retenir que le terme « résistance » qui apparaît le plus approprié puisque déjà utilisé dans le règlement Biocides. Ce choix peut aussi se justifier par le lien fréquent qui existe avec les antibiotiques lors de résistance croisée ou de co-résistance.

Un ensemble de définitions sont proposées par le GT et présentées dans le rapport. Parmi celles-ci figurent les définitions suivantes :

« Résistance » :

« La résistance est la réduction de sensibilité d'un micro-organisme vis-à-vis d'un biocide antibactérien du fait de son aptitude à supporter la ou les doses d'utilisation »

« Résistance croisée » :

« La résistance croisée est un processus dans lequel un micro-organisme, résistant à une substance active ou un produit biocide antibactérien auquel il a été exposé, est aussi résistant à une (ou plusieurs) autre(s) substance(s) antibactérienne(s) auxquelles il n'a pas été exposé »

« Adaptation » :

« L'adaptation est une évolution du comportement de souches bactériennes qui acquièrent des propriétés nouvelles transitoires ou stables, visant la résistance, l'augmentation de sensibilité, l'augmentation ou la diminution de la virulence, voire d'autres propriétés. Ce terme couvre, bien au-delà d'un développement de résistance, tous les types d'évolution possibles du comportement de bactéries suite à un changement de leur environnement. »

3.1.2. Modes d'action des biocides et mécanismes de résistance chez les bactéries

3.1.2.1 Mode d'action des principales familles de substances biocides

Les modes d'action des biocides antibactériens peuvent être définis en fonction des structures bactériennes ciblées. Ainsi, quatre sites d'action sont décrits dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Les différentes familles de biocides¹ antibactériens et les structures bactériennes ciblées

Action sur la paroi cellulaire	Action sur la membrane	Action sur les protéines	Action sur les acides nucléiques
Alcools Aldéhydes Bases Phénols	Acides Alcools Ammoniums quaternaires Bases Biguanides Isothiazolinones Métaux Oxydants Phénols	Acides Alcools Aldéhydes Bases Biguanides Isothiazolinones Métaux Oxydants Phénols	Acides Alcools Aldéhydes Biguanides Halogènes et dérivés Métaux Oxydants

La grande majorité des biocides antibactériens agissent sur plusieurs cibles compte-tenu de la réactivité chimique de la plupart d'entre eux.

3.1.2.2 Les mécanismes de résistance

La résistance des bactéries aux biocides peut être classée en deux catégories : intrinsèque et acquise. La résistance intrinsèque se définit comme une propriété déjà existante et inhérente à une espèce donnée, entraînant une baisse de la sensibilité ou une insensibilité au biocide.

Dans le cadre de cette saisine, seuls les phénomènes liés à la résistance acquise, susceptible de se développer lors de l'usage de biocides antibactériens, sont analysés.

La résistance est acquise, soit par transfert de gènes de résistance lors du contact entre deux bactéries selon un mécanisme principal dit de conjugaison en plus des mécanismes d'expression, de transduction et transformation, soit par mutation sur le chromosome bactérien de gènes régulateurs.

Concernant les mécanismes de résistance acquise, de nombreux travaux démontrent qu'ils reposent sur plusieurs grands mécanismes : modulation de l'activité des pompes à efflux, inactivation du biocide, modification de la cible, transfert horizontal de gènes, ou encore modification des propriétés membranaires. Ces mécanismes de résistance visent à contrer le mode d'action du biocide, c'est-à-dire empêcher la liaison du biocide à son site d'action.

A cela s'ajoute les cas particuliers que représentent les biofilms et l'effet protecteur par les protozoaires. Pour les biofilms, à côté des mécanismes cités précédemment, existent certains effets inhérents à ses structures comme par exemple les diffusions limitées des substances biocides à travers la matrice, la diversité des états physiologiques des bactéries en lien avec des gradients de nutriments et d'oxygène, les phénomènes de communication, les interactions avec une grande diversité de constituants des biofilms et la plus grande capacité à transférer du matériel génétique porteur de gènes de résistance.

¹ Certaines substances actives biocides citées dans le rapport annexé à l'avis, sont encore en cours d'examen d'évaluation dans le cadre du règlement européen Biocides (EU) No 528/2012. Leur approbation pour un TP donné n'a pas été confirmée à la publication de cet avis. D'autres substances actives ont déjà été approuvées et enfin d'autres encore n'ont pas fait l'objet d'une demande d'approbation.

3.1.3. Méthode d'évaluation de la résistance

Les travaux de la littérature relatifs à l'évaluation de la résistance des bactéries aux substances biocides ont communément l'objectif de savoir si certaines espèces bactériennes ont intrinsèquement une capacité d'adaptation à l'exposition aux biocides en devenant plus résistantes à ce biocide. Dans les cas où une telle capacité d'adaptation est observée, il s'agit alors d'en apprécier l'amplitude, en connaître la stabilité, et étudier si une résistance croisée, vis-à-vis d'autres antibactériens (autres biocides ou antibiotiques), se développe aussi.

Trois phases sont classiquement conduites lors des expérimentations en laboratoire :

- La 1^{ère} permet d'apprécier la capacité des souches bactériennes testées à réagir et à s'adapter à un environnement constitué de biocides.
- La 2^{nde} permet de caractériser la stabilité de l'adaptation : transitoire, (c'est-à-dire disparaissant après arrêt de l'exposition au biocide), ou stable/irréversible (se maintenant après l'arrêt de l'exposition au biocide).
- La 3^{ème} permet de déterminer le niveau de résistance.

A partir de cinq exemples d'utilisation des biocides (traitement de surfaces, produits de protection, produits d'hygiène humaine, produits de traitement de l'eau et produits de traitement des biofilms), une analyse bibliographique a été réalisée visant à lister les différentes méthodes permettant d'évaluer la capacité d'un produit biocide à induire une résistance sur les bactéries cibles. Cette analyse est présentée en détail dans le rapport du GT.

La capacité d'adaptation des bactéries est évaluée suite à un contact de la population bactérienne avec le biocide testé selon des conditions opératoires qui peuvent être variées (contacts uniques ou répétés, avec des concentrations faibles ou fortes), puis la recherche de la stabilité de cette résistance chez des bactéries (après exposition dans un milieu sans le biocide testé). Le cas échéant, les résistances croisées à d'autres biocides ou/et à des antibiotiques sont aussi évaluées. La recherche des mécanismes (gènes de résistance, mutation, ...) peut aussi compléter ces études.

Le niveau de résistance de bactéries à un biocide ou un antibiotique est généralement évalué via l'évolution de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), la cinétique de destruction et la cinétique de croissance. D'autres méthodes existent aussi, permettant d'affiner l'analyse du niveau de résistance observée (cytométrie de flux, détection de gènes de résistance).

Pour les cas particuliers des biofilms, il existe peu de méthodes standards pour évaluer la sensibilité de cellules bactériennes au sein de biofilms aux biocides désinfectants. Les méthodes les plus communément employées sont les suivantes : la détermination de la concentration minimale d'éradication du biofilm (CMEB) et le rapport des concentrations (Rc) ou des temps (Rt) requis pour obtenir la même réduction dans la population planctonique ou de biofilm, ou en comparant les réductions obtenues après exposition à la même concentration sur la même période de temps.

3.2. Proposition d'une approche méthodologique d'évaluation du risque d'apparition de résistance pour un produit ou une substance active biocide

Une approche méthodologique générale est proposée par le GT afin d'évaluer la capacité d'un produit ou d'une substance active biocide à induire une résistance bactérienne. Cette approche, applicable en laboratoire, doit être adaptée pour chaque produit biocide étudié en tenant compte des paramètres liés aux revendications (micro-organismes cibles, usages, milieux traités et conditions d'application).

Cette approche propose d'évaluer à la fois le développement de résistance des bactéries exposées aux concentrations d'emploi, mais aussi aux concentrations plus faibles, afin de tenir compte de l'exposition des bactéries cibles à des possibles résidus de biocides après l'élimination du produit (rinçage par exemple). Il est également proposé d'évaluer le développement de résistance croisée aux antibiotiques ou à d'autres produits biocides.

3.2.1. Construction de la démarche méthodologique

Le GT propose qu'une telle démarche méthodologique soit construite en plusieurs étapes :

- 1- Elaboration du protocole expérimental adapté au produit biocide :
 - a. Recenser de manière la plus complète possible les paramètres nécessaires à la mise en place des essais :
 - ✓ Paramètres liés aux produits (qualité de l'eau et pH, concentrations d'emploi, nature des traitements, temps de contact, procédé d'application, température) ;
 - ✓ Paramètres liés aux micro-organismes (choix des espèces pertinentes, taille de l'inoculum et état physiologique) ;
 - ✓ Paramètres en lien avec les environnements traités (substances interférentes, nature des surfaces, ...).
 - b. Déterminer la méthode d'évaluation de la résistance des espèces bactériennes cibles vis-à-vis du biocide étudié compte-tenu de ses usages et de ses conditions d'application.

2- Réalisation des essais

L'élaboration du protocole expérimental devra contenir deux étapes :

- ✓ Etape 1 : exposition des populations bactériennes au biocide, pour déterminer la capacité d'adaptation des bactéries, selon les méthodes les plus appropriées ;
- ✓ Etape 2 : si une résistance est observée à l'étape 1, confirmer ou pas la stabilité de cette résistance par une méthode appropriée ;
Le cas échéant, via une recherche bibliographique, vérifier l'existence d'une résistance croisée à d'autres biocides et antibiotiques.

Afin d'illustrer de manière pratique l'élaboration de ces protocoles expérimentaux, des exemples représentatifs de produits retrouvés dans les grands domaines d'utilisation des biocides antibactériens sont présentés dans le rapport du GT.

- 3- Analyser les résultats et conclure sur l'apparition ou pas d'un phénomène de résistance au travers d'un arbre décisionnel.

3.2.2. Exemple d'arbre décisionnel

A partir des données produites lors de la réalisation du protocole décrit ci-dessus, le risque potentiel de voir se développer un phénomène de résistance peut être évalué. A cet effet, un exemple d'arbre décisionnel est proposé (Figure 1). Cet arbre décisionnel est considéré comme un arbre de décision « simplifié », qui n'a pas pour vocation à décrire de façon exhaustive tous les cas envisageables.

Il est à noter que :

- Toute la démarche méthodologique faite ci-dessous vaut pour une évaluation d'un phénomène de résistance dans le cadre d'un dossier « Produit Biocide ». Dans le cas d'un dossier « Substance Active », cette démarche peut aussi s'appliquer dans la mesure où l'évaluation devra se faire sur le produit représentatif décrit dans le dossier.
- La même démarche est à suivre dans le cas d'un produit biocide ayant plusieurs substances actives.

L'arbre décisionnel proposé ci-après décrit le cas d'un produit X désinfectant, destiné à un traitement de surfaces dures, sans rinçage, appliqué à sa concentration d'emploi (CE). Cet exemple considère qu'une application unique est réalisée. L'exposition est réalisée à la concentration d'emploi « CE » et à deux concentrations CE/2 et CE/4.

Le protocole expérimental est composé de deux étapes :

Etape 1 : Détermination de la capacité d'adaptation des bactéries au biocide antibactérien testé.

Etape 2 : Détermination de la stabilité du phénomène de résistance et recherche de possible résistance croisée à d'autres biocides et antibiotique via une recherche bibliographique. Cette étape n'est réalisée que si une adaptation est observée à l'étape 1.

La CMI est ici choisie comme méthode d'évaluation de la résistance. Néanmoins, dans le rapport, un panel de méthodes est proposé. Le pétitionnaire a le libre choix d'utiliser la méthode la plus adaptée pour déterminer l'occurrence d'un phénomène de résistance.

Au préalable de l'étape 1, la détermination de la CMI « initiale » des souches prélevées sur le terrain (et le cas échéant des souches de collection des normes applicables du CEN TC 216) est à réaliser selon les méthodes décrites précédemment.

Suite à l'application du produit X, l'évaluation de la capacité d'adaptation des bactéries est réalisée (étape 1), suivie par la détermination du niveau de résistance selon la méthode de CMI :

- Si la CMI est identique à la CMI initiale après l'étape d'adaptation des souches de terrain, il est considéré que le risque de développement de résistance est absent dans les conditions d'application du produit X. Aucun test n'est nécessaire pour vérifier une résistance croisée aux autres biocides et ou antibiotiques.
- Si la CMI après l'étape d'adaptation est supérieure à la CMI initiale des souches de terrain alors un phénomène d'adaptation vis-à-vis du produit biocide X objet de l'étude est observé. Dans ce cas, le protocole expérimental sera poursuivi par l'étape 2 et sera alors vérifié de la même manière :
 - Si ce phénomène d'adaptation est stable ou non en l'absence du produit biocide X et ;
 - Le cas échéant en fonction des données de la littérature, s'il y a un risque de développement de résistance croisée à d'autres biocides (gamme de biocides de familles chimiques différentes et représentatifs du domaine d'utilisation) et ou antibiotiques (classiquement utilisés chez l'homme et, ou l'animal).

CE = concentration d'emploi
 CE/2, CE/4 représentent les concentrations
 rencontrées en sous dosage ou mauvaise élimination
 du produit
 (*) Désinfectant
 (**) CMI initiale des souches prélevées du terrain
 (***) via une recherche bibliographique

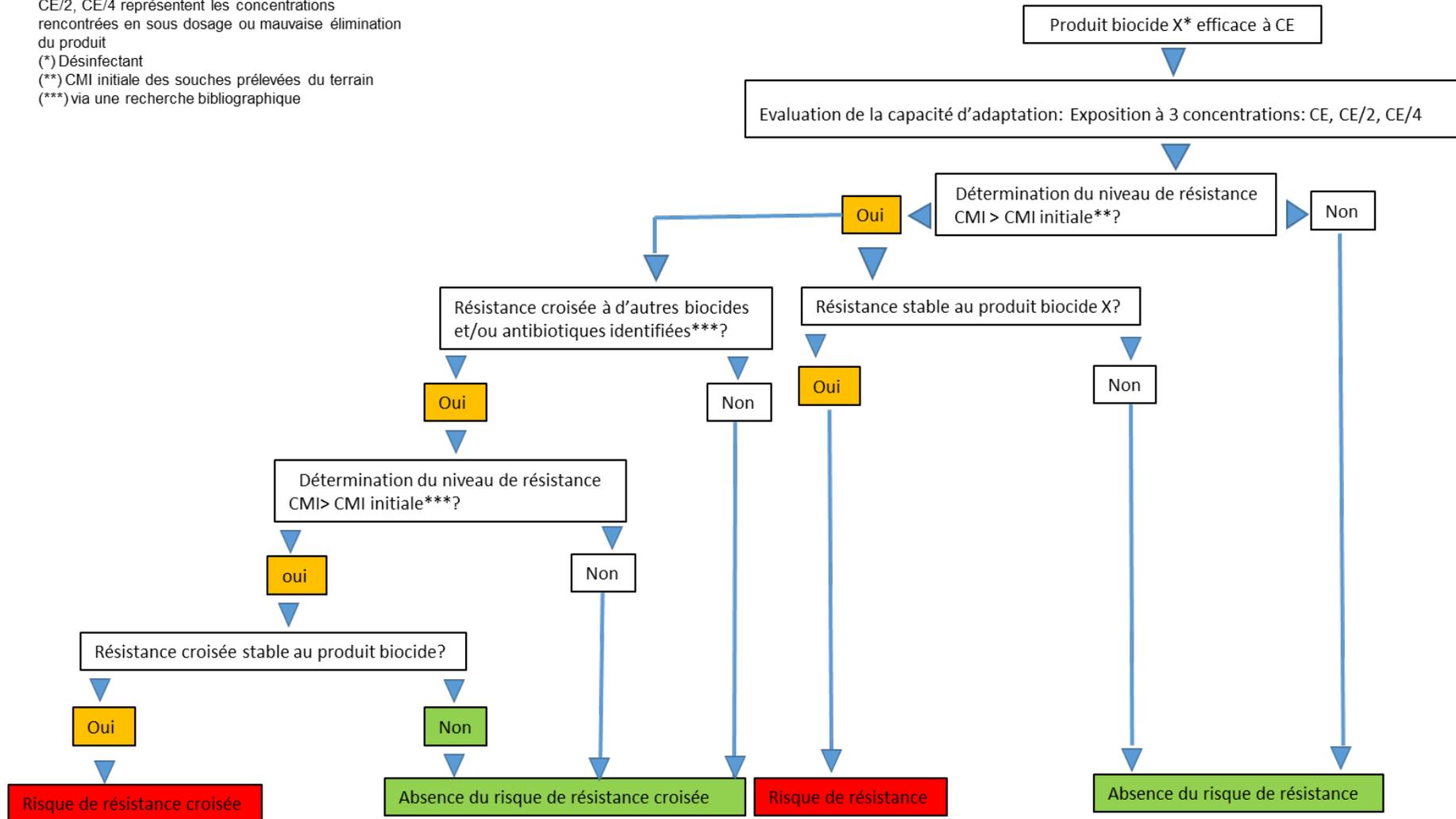


Figure 1 : Exemple d'un arbre décisionnel illustrant le protocole d'évaluation de résistance d'un produit désinfectant pour les surfaces

3.3. Stratégie de gestion de l'apparition de la résistance

Au titre du Règlement biocide (point 75 de l'annexe VI), si une résistance ou une résistance croisée à la substance active contenue dans le produit biocide est susceptible de se développer, l'organisme évaluateur doit prendre des mesures afin de réduire au minimum les conséquences de cette résistance.

3.3.1. Mesures de gestion

De manière générale, afin de prévenir l'apparition de résistance, il convient de limiter les mésusages pouvant notamment conduire à l'exposition des bactéries cibles à des concentrations sub-létales favorisant leur adaptation. Ainsi les instructions d'utilisation indiquées dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) annexé à l'autorisation doivent mentionner le respect absolu des conditions d'autorisation :

- Toujours lire l'étiquette ou la notice avant emploi et suivre toutes les consignes indiquées.
- Respecter les conditions d'emploi du produit (concentration, temps de contact, température, pH, etc).

L'obligation pour l'utilisateur professionnel d'analyser les causes d'inefficacité du traitement et d'informer le détenteur de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en cas d'inefficacité du traitement, participe également au suivi du risque d'apparition de résistance. Le GT a indiqué qu'il convient de le rappeler dans le RCP du produit.

Enfin, l'obligation pour le détenteur de l'AMM d'informer l'autorité compétente en cas d'effets inattendus ou nocifs, et notamment l'apparition de résistance est inscrite dans le règlement biocide (article 47, alinéa b). Il est proposé que cette obligation soit également rappelée dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP).

3.3.2. Suivi post autorisation ou post approbation (essais sur le terrain)

D'autre part, dans le cadre de l'évaluation d'un dossier de demande d'AMM ou dossier d'approbation de substance active, des études de laboratoire fournies dans le dossier, ou une analyse de la littérature scientifique peuvent mettre en évidence une suspicion de résistance ou de résistance croisée à d'autres antibactériens (antibiotiques ou biocides). Une gestion de la résistance doit alors être envisagée. Il peut être alors demandé aux pétitionnaires de mettre en place des expérimentations complémentaires en post-approbation (dans le cadre de l'approbation d'une substance active) ou post-AMM (lors de la mise sur le marché d'un produit). Des expérimentations en laboratoire seront demandées dans un premier temps, puis des suivis sur le terrain pourront être requis s'il est confirmé un phénomène de résistance stable suite aux expérimentations de laboratoire.

Dans le cas où la résistance et ou résistance croisée est observée dans des conditions qui ne respectent pas les conditions d'emploi du produit (sub-concentration d'emploi par exemple), le détenteur de l'AMM doit tout mettre en œuvre pour informer les utilisateurs de ces risques et les conseiller afin de respecter au mieux les conditions d'application du produit, et si ces phénomènes se déclenchent à des niveaux résiduels les orienter vers le choix de méthodes de contrôle adaptées.

Dans le cas où une résistance et ou résistance croisée est observée dans des conditions respectant les conditions d'emploi autorisées, ces résultats devront être confirmées sur le terrain.

Il est à souligner que contrairement aux études conduites en laboratoire, les protocoles ciblant la résistance aux biocides sur le terrain sont peu nombreux. Une majorité des études de terrain portant

sur le sujet de la résistance aux biocides sont associées à la résistance aux antibiotiques. En s'inspirant de ces études, il peut être ainsi proposé, sur plusieurs sites sur le terrain, un suivi des populations bactériennes de terrain sur plusieurs semaines à plusieurs mois dans des zones où le produit est utilisé strictement selon ses conditions d'emploi autorisées. La caractérisation des souches présentes et leur résistance pourra être investiguée à l'aide des techniques les plus appropriées.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

Le règlement Biocides (UE) 528/2012 stipule qu'il est nécessaire de s'assurer que chaque substance active approuvée ou produit biocide mis sur le marché n'induit pas d'effet inacceptable sur les organismes cibles en particulier une résistance ou une résistance croisée.

En l'absence de lignes directrices traitant du sujet de la résistance notamment pour les biocides antibactériens, il s'avère nécessaire de proposer une démarche d'évaluation de ce phénomène de résistance afin d'aider, autant les autorités compétentes que les pétitionnaires, à répondre aux exigences définies en différents points du règlement Biocides.

Les travaux du GT « Résistance aux biocides antimicrobiens » ont mené à la proposition d'une approche méthodologique afin d'évaluer la résistance bactérienne à l'usage des biocides antibactériens. Cette approche, à adapter au cas par cas, doit permettre d'évaluer la capacité des bactéries à s'adapter à un biocide antibactérien, à confirmer si ce phénomène de résistance est stable et de mesurer le niveau de cette résistance à ce biocide. Un exemple d'arbre décisionnel pour une mise en œuvre pratique est proposé.

De manière générale, afin de prévenir l'apparition de résistance, il convient de limiter les mésusages pouvant notamment conduire à l'exposition des bactéries cibles à des concentrations sub-létales favorisant leur adaptation. Ainsi un ensemble d'instructions d'utilisation génériques indiquées dans l'AMM sont proposées. De plus, s'il est constaté que l'utilisation est susceptible de conduire au développement de phénomènes de résistance, une gestion de cette résistance doit être envisagée en considérant, au cas par cas, le besoin de développer ou non des expérimentations sur le terrain, voire de mettre en place une surveillance spécifique à l'usage d'un produit donné sur une période suffisamment longue.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail recommande que, sur la base de l'expertise réalisée par le GT « Résistance aux biocides antibactériens », cette démarche d'évaluation de la capacité d'un biocide antibactérien à engendrer une résistance ou une résistance croisée chez les espèces cibles soit présentée au niveau Européen, au sein du groupe de travail « Efficacité » de l'Agence Européenne des Produits Chimiques (EChA), afin que des lignes directrices européennes qui seraient applicables par les pétitionnaires dans le cadre des demandes d'AMM ou d'approbation de substances actives soient établies et prises en compte dans l'évaluation des dossiers biocides.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Biocides, résistance, adaptation, désinfectant, conservateur, bactéries
Biocides, resistance, adaptation, disinfectant, preservative, bacteria

Saisine relative à l'évaluation de la résistance aux biocides antimicrobiens

Saisine n° 2016-SA-0238 « Résistance aux biocides antimicrobiens »

RAPPORT¹

d'expertise collective

« CES Substances et produits biocides »

« Groupe de travail résistance aux biocides antimicrobiens »

Juin 2019

¹Annule et remplace le rapport du 07/11/2019. Les modifications apportées au texte sont listées dans le tableau en Annexe 2 du présent rapport. Le rapport a été révisé le 18/06/2020.

Mots clés

Biocides, résistance, adaptation, désinfectant, conservateur, bactéries

Biocides, resistance, adaptation, disinfectant, preservative, bacteria

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

Groupe de travail (GT)

Président

M. Pierre MARIS – Retraité (Ancien directeur-adjoint Anses Fougères) – Microbiologie, désinfectants, résistance (démissionnaire depuis mai 2019)

Membres

M. Alain AYMARD – Retraité – Règlementation, classification et étiquetage

M. Jean Marc BERJEAUD – Enseignant chercheur – Microbiologie, biofilm

M. Philippe HARTEMANN – Retraité - Microbiologie, désinfectants, hygiène

Mme. Claire HELLIO – Professeur Chimie, écologie et biotechnologie – Ecologie, biotechnologie marine, biochimie marine

M. Christophe SOUMET – Chef d'unité AB2R (Fougères, Anses), ingénieur de recherche – Microbiologie, désinfectants, résistance

COMITÉ D'EXPERTS SPECIALISÉ

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par les réunions de CES suivantes :

CES Substances et produits biocides – 21/02/2019

CES Substances et produits biocides – 28/03/2019

CES Substances et produits biocides – 20/06/2019

Président

M. Georges DE SOUSA – Ingénieur de Recherche - Toxicologie - Méthodologie in vitro - Perturbateurs endocriniens – Cinétique

Membres

M. Olivier ADAM – Dirigeant chez Hydrobio – Conseil - Ecotoxicologie – Produits biocides TP8

M. ALAIN AYMARD – Retraité – Règlementation, classification et étiquetage

M. Jean Marc BERJEAUD – Enseignant chercheur – Microbiologie, biofilm

M. Romain BONAFOS – Ingénieur - Directeur d'unité – Entomologie agricole - Pesticides - Efficacité

M. Jean-Christophe CAHUZAC, vice-président - Responsable de la section de produits chimiques, biocides et substances dangereuses - Ingénieur des Laboratoires du Ministère des Finances - Physico-chimie – Méthodes d'analyse - Formulation – Règlementation

M. Emmanuel COMOY – Chef de Laboratoire – Chercheur vétérinaire – Microbiologie – Toxicologie – Evaluation des risques

M. James DEVILLERS – Directeur de CTIS – Ecotoxicologie - QSAR – Entomologie - LAV

M. Philippe HARTEMANN – Retraité – Microbiologie, désinfectants, hygiène

Mme. Claire HELLIO – Professeur Chimie, écologie et biotechnologie – Ecologie, biotechnologie marine, biochimie marine

M. Pierre MARIS – Retraité (Ancien directeur-adjoint Anses Fougères) – Microbiologie, désinfectants, résistance (démissionnaire depuis mai 2019)

M. Vincent RICHARD – Ingénieur de recherche chez DIRECCTE Haute Normandie – Chimie - Risque chimique – Sécurité au travail – Règlementation chimique

Mme. Annick VENANT – Retraité – Physico-chimie – Règlementation – Produits phytopharmaceutiques – Physico-chimie – Méthodes d'analyse – Spécifications

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme. Nabila HADDACHE– Evaluatrice scientifique U2EB – Anses

Contribution scientifique

Mme. Isabelle ATTIG – Chef U2EB - Anses

Mme. Nabila HADDACHE – Evaluatrice scientifique U2EB – Anses

Secrétariat administratif

Mme. Gabriela VECCHIO – Anses

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	9
Liste des tableaux	10
Liste des figures	10
1 Introduction	11
2 Définitions	13
2.1 Des définitions générales globalisantes concernant le terme « résistance »	13
2.2 Des définitions qui positionnent le terme « résistance » par rapport au terme « tolérance » ou l'expression « sensibilité réduite »	14
2.2.1 « Résistance »	14
2.2.2 « Tolérance »	14
2.2.3 « Sensibilité réduite ».....	14
2.3 Des définitions descriptives évoquant la nature des mécanismes de résistance	15
2.4 « Résistance croisée » et « Co-résistance »	15
2.4.1 « Résistance croisée ».....	15
2.4.2 « Co-résistance »	15
2.5 Autres termes	15
2.6 Cas des biofilms	16
3 Modes d'action des biocides antibactériens	18
3.1 Les acides	18
3.2 Les alcools	19
3.3 Les aldéhydes	19
3.4 Les ammoniums quaternaires (QACs)	19
3.5 Les bases	19
3.6 Les biguanides	20
3.7 Les halogènes et leurs dérivés	20
3.7.1 Les composés chlorés	20
3.7.2 L'iode.....	20
3.8 Les isothiazolinones	21
3.9 Les oxydants	21
3.9.1 Le peroxyde d'hydrogène	21
3.9.2 L'acide peracétique (APA)	22
3.10 Les métaux	22
3.11 Les Phénols	22
3.11.1 Le triclosan	22
3.11.2 Le chlorocrésol (CMK).....	23

4	Les mécanismes de résistance aux biocides antibactériens	24
4.1	Modulation de l'activité des pompes à efflux.....	25
4.2	Inactivation du biocide	25
4.3	Modification de la cible.....	25
4.4	Transfert horizontal de gènes.....	25
4.5	Modifications des propriétés membranaires.....	25
4.6	Adaptation physiologique (phénotypique)	26
4.6.1	Cas des biofilms : Mécanismes identifiés comme jouant un rôle dans la résistance du biofilm aux biocides	26
4.6.2	Cas des bactéries intra-protistes.....	26
5	Méthodes d'évaluation de la résistance	28
5.1	Méthodes d'évaluation de la capacité des bactéries à développer une résistance et sa stabilité.....	28
5.1.1	Principe des méthodes	28
5.1.2	Evaluation de la capacité d'adaptation des bactéries aux biocides	29
5.1.3	Evaluation de la stabilité de l'adaptation au biocide	30
5.2	Méthodes d'évaluation du niveau de résistance.....	30
5.2.1	Les grands domaines d'utilisation des biocides	31
5.2.1.1	Produits de traitement des surfaces	31
5.2.1.2	Produits de protection	31
5.2.1.3	Produits de traitement des eaux.....	31
5.2.1.4	Produits d'hygiène humaine	32
5.2.1.5	Traitement des biofilms	33
5.2.2	Méthodologies d'évaluation du niveau de résistance microbienne aux biocides antibactériens concernant les produits de traitements de surfaces, les produits d'hygiène humaine, les produits de traitement des eaux et les produits de protection.....	33
5.2.2.1	Détermination de CMI des biocides.....	34
5.2.2.2	Evaluation de l'apparition de résistance par CMS.....	35
5.2.2.3	Détermination de la CMI des antibiotiques.....	36
5.2.2.4	Mesure de l'effet de biocides par diffusion sur disques	36
5.2.2.5	Détermination de la CMB aux biocides	37
5.2.2.6	Cinétique de croissance ou de destruction.....	37
5.2.2.7	Détection de bactéries résistantes aux biocides par cytométrie de flux	38
5.2.2.8	Détection de gènes de résistance aux biocides	38
5.2.3	Méthodologies spécifiques aux biofilms	39
5.2.3.1	Méthodologies d'évaluation du niveau de résistance microbienne aux biocides antibactériens- Biofilms	39
5.2.3.1.1	<i>Test CMEB</i>	39
5.2.3.1.2	<i>Rc et Rt</i>	39
5.2.3.2	Méthodes d'étude des mécanismes de résistance au sein des biofilms	40
5.2.3.2.1	<i>Détermination de la diminution de transport d'un biocide au sein d'un biofilm par microscopie confocale à balayage laser (MCBL)</i>	40
5.2.3.2.2	<i>Détermination de la modification de la membrane externe des bactéries dans un biofilm par RT-PCR, SDS-polyacrylamide</i>	40
5.2.3.2.3	<i>Evaluation de l'efficacité de biocide et la résistance de certaines bactéries au sein d'un biofilm par la méthode d'hybridation in situ en fluorescence (FISH)</i>	41
6	Guide pour la construction d'une approche méthodologique d'évaluation de la capacité des bactéries à développer une résistance ..	42
6.1	Recenser de manière la plus complète possible les paramètres nécessaires à la mise en place de l'approche méthodologique (étape 1.a de l'avis)	42

6.1.1	Choix des paramètres liés aux produits.....	42
6.1.2	Choix des paramètres liés aux micro-organismes.....	42
6.1.3	Choix des paramètres en lien avec les environnements traités	43
6.2	Déterminer la méthode d'évaluation de la résistance des espèces bactériennes cibles vis-à-vis du produit biocide (étape 1.b de l'avis)	43
6.2.1	Paramètres communs à tous les domaines d'utilisation.....	44
6.2.1.1	Choix des paramètres liés au produit	44
6.2.1.1.1	<i>Choix des concentrations d'essais et de la qualité des solutions d'essais</i>	<i>44</i>
6.2.1.1.2	<i>Choix des fréquences d'application du produit et de ses séries de concentrations, puis de la durée des contacts « produits – micro-organismes »</i>	<i>44</i>
6.2.1.1.3	<i>Choix des paramètres liés aux micro-organismes : choix des micro-organismes d'essais et des suspensions d'essais</i>	<i>44</i>
6.2.1.1.4	<i>Choix des paramètres en lien avec les environnements traités : choix des milieux et conditions physiques d'application</i>	<i>44</i>
6.2.1.1.5	<i>Détermination des niveaux de résistance.....</i>	<i>44</i>
6.3	Réalisation des essais : Exemples de choix de paramètres pour chaque grand domaine d'utilisation (étape 2 de l'avis)	45
6.3.1	Produits de protection antibactériens	46
6.3.1.1	Choix des paramètres liés au produit	46
6.3.1.1.1	<i>Choix des concentrations d'essais et de la qualité des solutions d'essais</i>	<i>46</i>
6.3.1.1.2	<i>Choix des fréquences d'application du produit et de ses séries de concentrations, puis de la durée des contacts « produits – micro-organismes »</i>	<i>46</i>
6.3.1.1.3	<i>Choix des paramètres liés aux micro-organismes : choix des micro-organismes d'essais et des suspensions d'essais</i>	<i>46</i>
6.3.1.2	Choix des paramètres en lien avec les environnements traités : choix des milieux et conditions physiques d'application	46
6.3.1.3	Détermination des niveaux de résistance.....	46
6.3.2	Produits destinés à l'hygiène humaine	46
6.3.2.1	Choix des paramètres liés au produit	46
6.3.2.1.1	<i>Choix des concentrations d'essais et de la qualité des solutions d'essais</i>	<i>47</i>
6.3.2.1.2	<i>Choix des fréquences d'application du produit et de ses séries de concentrations, puis de la durée des contacts « produits-micro-organismes ».....</i>	<i>47</i>
6.3.2.2	Choix des paramètres liés aux micro-organismes : choix des micro-organismes d'essais et des suspensions d'essais	47
6.3.2.3	Choix des paramètres en lien avec les environnements traités : choix des milieux et conditions physiques d'application	47
6.3.2.4	Détermination des niveaux de résistance.....	47
6.3.3	Produits de traitement de l'eau	48
6.3.3.1	Choix des paramètres liés au produit	48
6.3.3.1.1	<i>Choix des concentrations d'essais et de la qualité des solutions d'essais</i>	<i>48</i>
6.3.3.1.2	<i>Choix des fréquences d'application du produit et de ses séries de concentrations, puis de la durée des contacts « produits – micro-organismes »</i>	<i>48</i>
6.3.3.2	Choix des paramètres liés aux micro-organismes : choix des micro-organismes d'essais et des suspensions d'essais	48
6.3.3.3	Choix des méthodes de numération bactérienne	48
6.3.3.4	Choix des paramètres en lien avec les environnements traités : Choix des milieux et conditions physiques d'application	48
6.3.3.5	Détermination des niveaux de résistance.....	48
6.3.4	Produits de traitement des biofilms.....	49
6.3.4.1	Choix des paramètres liés au produit	49
6.3.4.1.1	<i>Choix des concentrations d'essais et de la qualité des solutions d'essais</i>	<i>49</i>
6.3.4.1.2	<i>Choix des fréquences d'application du produit et de ses séries de concentrations, puis de la durée des contacts « produits – biofilms »</i>	<i>49</i>
6.3.4.2	Choix des paramètres liés aux micro-organismes : choix des micro-organismes d'essais et des suspensions d'essais	49
6.3.4.3	Choix des paramètres en lien avec les environnements traités : choix des milieux et conditions physiques d'application	49
6.3.4.4	Détermination des niveaux de résistance.....	49

6.4	Analyse des résultats et conclusion sur l'apparition ou pas d'un phénomène de résistance au travers d'un arbre décisionnel : Exemple d'arbre décisionnel (étape 3 de l'avis).....	50
7	Stratégies de gestion de l'apparition de la résistance	54
7.1	Mesures de gestion.....	54
7.2	Suivi post autorisation ou post approbation.....	54
7.3	Suivis sur le terrain.....	55
8	Conclusions du groupe de travail.....	57
9	Bibliographie	58
9.1	Publication.....	58
9.2	Normes et guides	65
9.2.1	Normes.....	65
9.2.2	Guides.....	65
9.3	Législation et réglementation	66
10	Annexe 1 : Les principaux types de produits concernés par les travaux de l'autosaisine	67
11	Annexe 2 : suivi des actualisations du rapport	69
12	Annexe 3 : Décision de l'auto-saisine	70

Sigles et abréviations

AMM: Autorisation de Mise sur le Marché

ASTM: American Society for Testing and Materials

CEN/TC 216: Technical Committee « Chemical Disinfectants and Antiseptics »- European Committee for standardization

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

CLSM: Microscopie Confocale à Balayage Laser

CMB: Concentration Minimale Bactéricide

CMEB: Concentration Minimale Eradication du Biofilm

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

CMS: Concentration Minimale Sélective

ECHA: European CHEmical Agency- Agence Européenne des Produits Chimiques

ECOFF: Epidemiological Cut-OFF

EPS: ExoPolySaccharide

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FISH: Fluo *In Situ* Hybridization

GT: Groupe de Travail

LPS: LipoPolySaccharide

MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

MDR: Multi-Drug Resistance

MSC: Concentration Minimale Sélective

NF EN: Norme française « European Norm »

OMP: Outer Membrane Proteins

PCR: Polymerase Chain Reaction

Rc: Rapport des concentrations

RCP: Résumé des Caractéristiques du Produit

Rt: Rapport des temps

RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

SARM: *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline

SCCS: Scientific Committee on Consumer Safety

SCENIHR: Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks

SHA: Solution HydroAlcoolique

SHRM: *Staphylococcus haemolyticus* résistant à la méricilline

TP: Type de Produit

UFC: Unités Formant Colonies

US FDA: U.S Food & Drugs Administration

UV: Ultra-Violet

BVNC: Bactéries Viables et Non-Cultivable

VNC: Viable Non Cultivable

WG: Working Group

WT: Wild Type

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différentes familles de biocides antibactériens et les structures bactériennes ciblées.....	18
Tableau 2: Exemples de coefficients de résistance des cellules de biofilm par rapport aux cellules planctoniques en présence de désinfectants couramment utilisés (Bridier <i>et al.</i> 2011).	39

Liste des figures

Figure 1 : Les mécanismes de résistance acquise aux biocides antibactériens (Gnanadhas, 2013).....	24
Figure 2 : Représentation schématique des taux de croissance en fonction des concentrations d'antibiotique. CMI sens (ligne bleue) des souches sensibles. CMI res (ligne rouge) des souches résistantes (Gullberg <i>et al.</i> 2011, Sandegren 2014).	36
Figure 3 : Exemple d'un arbre décisionnel illustrant le protocole d'évaluation de résistance d'un produit désinfectant pour les surfaces	53

1 Introduction

Le Règlement européen n°528/2012 du 22 mai 2012, en application depuis le 1er septembre 2013, régit la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides, visant à améliorer la libre circulation des produits biocides dans l'Union Européenne tout en garantissant un niveau élevé de protection de la santé humaine et animale et de l'environnement.

Selon les définitions du Règlement biocide, un produit biocide est défini comme : « toute substance ou tout mélange, sous la forme dans laquelle il est livré à l'utilisateur, constitué d'une ou plusieurs substances actives, en contenant ou en générant, qui est destiné 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 autre qu'une simple action physique ou mécanique ».

Cette saisine relative à la résistance aux biocides, cible les biocides antimicrobiens à action antibactérienne, utilisés dans de très nombreux domaines, notamment ceux de l'hygiène humaine et vétérinaire, de l'industrie, des eaux, aussi bien en tant que produits désinfectants que produits de protection.

L'usage croissant des biocides antibactériens dans quasiment toutes les activités humaines est aussi à replacer dans le contexte plus général du développement exponentiel à l'échelle planétaire de la résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques, entraînant des échecs de traitements des maladies infectieuses humaines et animales (rapport Jim O'Neil mai 2016, et l'émergence de bactéries résistantes dans l'environnement (Flach *et al.* 2017, Ekwanzala *et al.* 2018).

D'une manière générale, les bactéries sont capables de s'adapter rapidement à de nouvelles conditions environnementales, leur permettant de survivre ou croître, par exemple, après exposition à certains antibactériens. Pour cela, elles mettent en œuvre une batterie de mécanismes d'adaptation pouvant conduire au développement de résistance.

Ainsi, la résistance bactérienne à différents types de biocides a été signalée dans de nombreux travaux scientifiques depuis plusieurs années (Randall *et al.* 2007, Mullapudi, Siletzky, et Kathariou 2008, Webber *et al.* 2008, Ortiz, López, et Martínez-Suárez 2014, Meier *et al.* 2017).

Les connaissances sur la caractérisation de cette résistance et sur l'identification des mécanismes qui la supportent, sont en régulière évolution ces dernières années mettant en évidence certaines similarités avec les mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques (SCENIHR, 2009²).

En cohérence avec ce constat, le Règlement biocide stipule respectivement dans le considérant 37 puis dans l'article 19 [(1.b) ii] que:

« Lors de l'autorisation d'un produit biocide, il est nécessaire de s'assurer que ce produit, lorsqu'il est correctement utilisé pour l'usage auquel il est destiné, est suffisamment efficace et n'induit pas d'effet inacceptable tel qu'une résistance chez les organismes cibles ni de souffrance ou de douleur inutile dans le cas des vertébrés ».

« Le produit biocide n'a aucun effet inacceptable sur les organismes cibles, en particulier une résistance ou une résistance croisée inacceptable, ou des souffrances et des douleurs inutiles chez les vertébrés »

L'Anses s'est donc autosaisie du sujet le 9 novembre 2016 afin de proposer des méthodes d'évaluation d'apparition d'un phénomène de résistance/résistance croisée, c'est-à-dire l'évaluation de la capacité, du niveau et du maintien d'une résistance pouvant être développées par les bactéries suite à une exposition aux substances et produits biocides. Des stratégies de gestion de la résistance seront également proposées le cas échéant.

Pour y répondre, il est important en préambule de présenter :

- 1- Les différentes définitions liées aux phénomènes de résistance, les grandes familles de substances actives biocides, leurs modes d'action et les mécanismes de résistances impliqués.

² Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks- Assessment of Antibiotic Resistance Effects of Biocides (28th plenary of 19 January 2009 after public consultation : https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consultations/public_consultations/scenih_r_cons_09_en

- 2- Sur la base d'une synthèse bibliographique, les approches méthodologiques existantes permettant d'évaluer la capacité des bactéries à développer une résistance.

Une démarche d'évaluation du phénomène de résistance applicables aux produits ou substances actives biocides est ensuite proposée. Au travers d'un protocole expérimental, divers choix méthodologiques seront faits en cohérence avec les usages et conditions d'application des biocides antibactériens. Ces choix seront intégrés dans un arbre décisionnel permettant in fine d'apprécier le risque de développement de résistance voire de résistances croisées à d'autres biocides antibactériens ou aux antibiotiques. Des stratégies de gestion de l'apparition de la résistance seront ensuite proposées.

Cette autosaisine n'aborde pas le sujet du développement de la résistance bactérienne aux antibactériens dans l'environnement, lié aux rejets de résidus de produits biocides dans l'environnement. Une saisine traitant l'antibiorésistance dans l'environnement est gérée au sein du Département de l'Evaluation des Risques par l'unité « Evaluation des risques liés à l'eau »

2 Définitions

L'analyse bibliographique sur le thème de la résistance des micro-organismes aux biocides antibactériens, conduit au constat que des divergences fortes apparaissent entre les auteurs dans les définitions les plus essentielles.

Un certain nombre de termes ou expressions qui sont utilisés relèvent d'un phénomène d'adaptation de bactéries aux biocides antibactériens : résistance, tolérance, sensibilité réduite, résistance croisée, co-résistance, résistance acquise, et biofilm, ...

Il est à noter que d'autres expressions sont retrouvées dans la littérature incluant ou suggérant aussi le terme résistance : insensibilité, résistance intrinsèque, résistance innée, résistance naturelle, résistance stable ou transitoire, ...

- « Résistance intrinsèque », « résistance innée », « résistance naturelle », « insensibilité »

Les expressions « résistance intrinsèque ou innée ou naturelle », auxquelles est ajouté le terme « insensibilité », sont des expressions équivalentes quant à leur sens et représentent le comportement homogène des souches d'une espèce microbienne donnée, voire d'un genre donné, vis-à-vis d'une substance active ou d'un produit biocide, ceci indépendamment de tout phénomène d'adaptation. Cette insensibilité se traduit par la résistance relative d'une espèce bactérienne précise en comparaison à d'autres espèces bactériennes. C'est la détermination du spectre d'activité d'un biocide qui va révéler cette insensibilité particulière (Davison et al. 2000, Cloete 2003, Sheldon 2005, Gnanadhas, Marathe, et Chakravorty 2013, Wales et Woodward 2015).

Au final les termes « résistance intrinsèque / innée / naturelle » sont hors champ de cette saisine puisqu'ils ne représentent en rien le développement de phénomènes d'adaptation suite à une exposition à un antibactérien, pouvant conduire à une résistance.

2.1 Des définitions générales globalisantes concernant le terme « résistance »

Quelques exemples de définitions globalisantes du mot « résistance » sont cités ci-dessous :

- « La perte significative de performance due à la capacité d'un organisme cible à résister aux effets des concentrations normalement appliquées d'un produit biocide. » (TNsG 20083).
- « La capacité d'une bactérie à supporter les effets d'un agent chimique nocif » (SCENIHR 2009; SCCS 20104).
- « Le changement de sensibilité à un microbicide qui le rend inefficace vis-à-vis d'un micro-organisme qui était auparavant sensible à ce microbicide » (Maillard et al. 2013 (a)).

Ces définitions générales n'introduisent pas la notion d'activité, qu'elle soit bactéricide ou bactériostatique, et peuvent ainsi s'appliquer à tous les types d'usages rencontrés au sein de la large famille des biocides, des produits de protection aux produits désinfectants. Ces définitions n'introduisent pas non plus les notions d'adaptation transitoire ou permanente, c'est-à-dire celles disparaissant ou persistant en l'absence du biocide.

³ Technical Notes for Guidance on Product Evaluation (February, 2008)

⁴ Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)- 2010- Opinion on triclosan- Antimicrobial Resistance (7th plenary of 22 June 2010 after public consultation : http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_023.pdf)

2.2 Des définitions qui positionnent le terme « résistance » par rapport au terme « tolérance » ou l'expression « sensibilité réduite »

Ce positionnement se fait sur la base du type d'activités, bactéricide et bactériostatique, qui peuvent être aussi quantifiées par des valeurs de concentrations minimales bactéricides (CMB) ou de concentrations minimales inhibitrices (CMI). Des divergences dans les définitions apparaissent selon les auteurs :

2.2.1 « Résistance »

« Résistance : survie d'un micro-organisme à l'exposition à une concentration de biocide qui tue le reste de la population » (Russell 2003, Maillard 2007).

« Résistance est utilisée lorsqu'une souche bactérienne n'est pas tuée ou inhibée à une concentration atteinte en pratique et en situation dans laquelle la majorité des bactéries de la même souche sont sensibles » (SCENIHR 2009).

« Résistance se réfère aux micro-organismes qui peuvent survivre mais sans se multiplier à la concentration recommandée du désinfectant » (Martinez 2005).

« Résistance lorsqu'un micro-organisme survit ou se multiplie à une concentration en désinfectant plus élevée qu'un autre micro-organisme » (Langsrud 2003).

« Résistance est une description d'une relative insensibilité d'un micro-organisme à un traitement particulier sous des conditions particulières » (Gilbert et McBain 2003).

2.2.2 « Tolérance »

« Tolérance peut être définie comme l'aptitude d'un micro-organisme à supporter l'effet d'une dose létale d'un biocide par ingestion de doses sub-létales pendant une courte période » (TNsG 2008).

Cette définition présente dans le document guide européen (TNsG 2008) accompagnant le règlement Biocides, s'appliquerait à des biocides type insecticides ou rodenticides du fait du mode d'action cité « par ingestion ».

« Tolérance renvoie à une survie liée à un effet d'inhibition et non de destruction » (Maillard 2007, Gnanadhas, Marathe, et Chakravorty 2013, Maillard et al. 2013 (a), Wesgate, Pierre Grasha, et Maillard 2016).

« Tolérance se traduit par une diminution de sensibilité à une molécule antibactérienne, se caractérisant par une CMI élevée ou une situation dans laquelle un conservateur n'empêche plus la croissance microbienne » (SCCS 2010 ; SCENIHR 2009).

« Tolérance est à mettre en relation avec un micro-organisme qui se développe dans des conditions défavorables – Survivre et se multiplier à la concentration d'utilisation d'un désinfectant voire au-delà de cette concentration » (Martinez 2005).

« Tolérance lors d'une adaptation à des concentrations inhibitrices » (Cerf, B. Carpentier, et Sanders 2010).

2.2.3 « Sensibilité réduite »

Cette expression, ou son expression équivalente « diminution de sensibilité », est aussi régulièrement citée comme une alternative au terme « résistance » dont la définition ne fait pas consensus. Là aussi des divergences existent entre les auteurs. Pour les uns (Maillard 2007, Maillard *et al.* 2013 (a), Wesgate, Grasha, et Maillard 2016), elle correspond à une augmentation de CMB ou de CMI en comparaison de celles de la population initiale ou d'une souche de référence. Pour les autres (Martinez 2005), elle se réfère à un micro-organisme qui n'est pas détruit par la concentration d'un désinfectant qui normalement le détruit.

En conclusion, ces trois séries de définitions révèlent des contradictions. Le terme « résistance » peut être lié soit à un effet uniquement bactéricide ou, à la fois bactéricide et bactériostatique. Des contradictions de même nature sont notées entre les auteurs pour le terme « tolérance ». De plus, de nombreuses définitions du terme « résistance » englobent celles retrouvées sous le terme « tolérance ». Enfin, les définitions de l'expression « sensibilité réduite » présentent aussi des contradictions du même ordre.

2.3 Des définitions descriptives évoquant la nature des mécanismes de résistance

Pour certains auteurs, la notion de résistance repose sur la recherche de mécanismes, notamment la présence et l'expression de gènes de résistance, qui doivent l'objectiver (Vali *et al.* 2008).

Suivant une démarche similaire à celle du domaine des antibiotiques, une distinction peut être faite (Wales et Woodward 2015) entre la résistance microbiologique et la résistance clinique.

La première tient compte de l'existence d'un ou plusieurs mécanismes en comparant les souches sensibles et résistantes, ceci supposant des analyses phénotypiques et génotypiques.

La seconde tient compte du contexte de l'application ; ces auteurs suggèrent de n'employer ni le terme « résistance », ni le terme « tolérance » mais « diminution de sensibilité ». Enfin, un autre auteur (Morrissey *et al.* 2014) fait aussi un parallèle avec les antibiotiques en proposant une approche méthodologique déterminant un seuil épidémiologique (ECOFF : « epidemiological cut-off ») permettant de différencier les souches résistantes des souches sensibles.

2.4 « Résistance croisée » et « Co-résistance »

Globalement, après analyse bibliographique, les définitions de ces deux expressions sont assez similaires d'un auteur à l'autre.

2.4.1 « Résistance croisée »

Deux exemples de définition :

« Résistance croisée lorsque des organismes résistants à une substance active sont aussi résistants à d'autres substances actives auxquelles ils n'ont pas été exposés » (TNsG 2008).

« Résistance croisée est un processus dans lequel la résistance à un agent antibactérien confère une résistance à un autre agent antibactérien, car le même mécanisme de résistance s'applique aux deux agents antibactériens » (Gnanadhas, Marathe, et Chakravorty 2013, Wales et Woodward 2015).

La première définition est plus commune dans la littérature et similaire à celle s'appliquant aux antibiotiques. Par ailleurs, cette résistance croisée associe souvent les biocides antibactériens et les antibiotiques. La seconde définition, si elle est un peu plus précise puisqu'elle introduit le terme « mécanisme », cependant elle ne mentionne pas un point essentiel qui est la non-exposition des organismes à l'autre agent antibactérien.

2.4.2 « Co-résistance »

La co-résistance réfère à la présence de plusieurs mécanismes de résistance présents dans le même organisme, correspondant à une série de déterminants génétiques physiquement liés sur un même élément génétique mobile dont le transfert et l'expression interviennent de manière coordonnée (Gnanadhas, Marathe, et Chakravorty 2013, Wales et Woodward 2015). La définition suivante est proposée pour ce terme :

La co-résistance est un processus dans lequel plusieurs mécanismes de résistance présents dans un même micro-organisme correspondent à une série de déterminants génétiques physiquement liés sur un même élément génétique mobile dont le transfert et l'expression interviennent de manière coordonnée .

2.5 Autres termes

D'autres termes qui pourraient être pris en considération lors d'une évaluation du comportement de bactéries au contact de substances chimiques du type biocides sont cités :

« *Persisters cells* » : potentiellement, ces cellules bactériennes dormantes, métaboliquement actives, peuvent résulter de l'application de substances chimiques. Néanmoins il est à vérifier si elles présentent ou non des critères de résistance au sens de cette saisine.

« Bactéries Viables et Non-cultivables (BVNC) » : ce changement d'état de cellules bactériennes non cultivables sur les milieux de culture conventionnels est un phénomène très important ayant pour

conséquence une sous-estimation du nombre de bactéries viables. Cet état est totalement ignoré dans les méthodes normalisées d'évaluation de l'activité des biocides antibactériens. Cependant, il ne signifie pas *a priori* « résistance » au sens de cette saisine.

« Sélection » : ce terme est à employer lorsqu'un produit biocide agit sur une population microbienne hétérogène composée de cellules plus ou moins sensibles ou résistantes. Cette pression de sélection ne signifie pas induction de résistance mais participe à la sélection de micro-organismes naturellement plus résistants ou dont la résistance est une résultante d'un phénomène d'adaptation.

« Adaptation » : ce terme très général peut être considéré comme une évolution du comportement de souches bactériennes qui acquièrent des propriétés nouvelles transitoires ou stables, visant la résistance, l'augmentation de sensibilité, l'augmentation ou la diminution de la virulence, voire d'autres propriétés. Ce terme couvre, bien au-delà d'un développement de résistance au sens de la saisine, tous les types d'évolution possibles du comportement de bactéries suite à un changement de leur environnement.

2.6 Cas des biofilms

Une particularité dans ces définitions concerne la résistance de cellules microbiennes au sein de biofilms. Dans ce cas, elle correspond à une somme de phénomènes comme la diffusion limitée d'une substance antibactérienne au sein de la matrice de composition complexe que constitue le biofilm, l'interaction de cette substance avec les composants du biofilm, le rôle des enzymes, le rôle de l'activité métabolique au sein d'un biofilm, l'adaptation génétique, les pompes à efflux et la structure de la membrane externe des bactéries. De plus, la définition de « résistance » doit être clarifiée selon que l'on considère des cellules en phase planctonique ou présentes au sein d'un biofilm. Dans le premier cas, une souche microbienne est définie comme étant résistante à un biocide si elle n'est pas inactivée par une concentration spécifique ou une période d'exposition qui inactive habituellement la majorité des autres souches. Dans le second cas, les cellules bactériennes au sein de biofilms, sont généralement considérées comme résistantes par rapport à leurs contreparties planctoniques.

La résistance des bactéries du biofilm aux biocides peut être intrinsèque, génétiquement acquise (transfert et mutation), phénotypique (tolérance), ou apparente par protection de l'action du biocide dans l'environnement du biofilm. Elle est parfois considérée comme une tolérance plutôt qu'une véritable « résistance » car elle est principalement induite par une adaptation physiologique au mode de vie du biofilm (croissance sessile, stress nutritionnel, contact avec des concentrations sub-létales répétées de désinfectant) et est perdue ou nettement réduite lorsque les cellules au sein des biofilms retournent à l'état planctonique.

Une définition de la notion de résistance appliquée aux biofilms est ainsi proposée :

« Au regard de la grande complexité des biofilms à l'état naturel, la nature de la résistance est, dans la majorité des cas, multifactorielle et notamment en lien avec leurs structures et organisations spatiales, la diversité des états physiologiques des bactéries au sein des biofilms, la diversité de la capacité des bactéries à s'adapter, et les phénomènes de communication intervenant au sein des biofilms ».

Conclusion

De ce chapitre, il apparaît que l'ensemble des définitions des termes ou expressions retrouvés dans la bibliographie en lien avec le phénomène de résistance, peuvent être rassemblées en deux groupes :

- Celles pour lesquelles la similarité des définitions entre les auteurs conduit à un consensus (résistance croisée et co-résistance) et,
- Celles pour lesquelles une réflexion plus poussée s'avère nécessaire (résistance, tolérance et sensibilité réduite) afin de dégager des éléments objectifs et permettant de formuler des propositions de définitions.

Face au constat qu'aucune distinction claire ne peut être faite entre ces 3 derniers termes, il paraît judicieux de ne retenir que le terme « résistance » qui, apparaît le plus approprié puisque déjà utilisé dans le règlement biocide. Ce choix peut aussi se justifier par ce lien fréquent qui existe avec les antibiotiques lors de résistance croisée ou de co-résistance.

Ce terme unique étant employé dans de nombreuses situations couvertes par la réglementation sur les biocides antibactériens, il est essentiel d'en préciser le sens en établissant un lien d'une part avec le type d'usage et d'autre part avec la nature de cette résistance (résistance acquise par effet de mutations ou par

acquisition de gènes – adaptation stable ou transitoire pouvant disparaître lors de l'élimination du biocide) afin d'en évaluer les conséquences lors des traitements. Ces définitions doivent aussi prendre en compte les phénomènes de résistances croisées à d'autres biocides ou, et des antibiotiques.

Ci-dessous, les définitions⁵ proposées par le GT :

« Résistance » :

« La résistance est la réduction de sensibilité d'un micro-organisme vis-à-vis d'un biocide antibactérien du fait de son aptitude à supporter la ou les doses d'utilisation ».

« Adaptation » :

« L'adaptation est une évolution du comportement de souches bactériennes qui acquièrent des propriétés nouvelles transitoires ou stables, visant la résistance, l'augmentation de sensibilité, l'augmentation ou la diminution de la virulence, voire d'autres propriétés. Ce terme couvre, bien au-delà d'un développement de résistance au sens de la saisine, tous les types d'évolution possibles du comportement de bactéries suite à un changement de leur environnement. »

« Résistance croisée » :

« La résistance croisée est un processus dans lequel un micro-organisme, résistant à une substance active ou un produit biocide antibactérien auquel il a été exposé, est aussi résistant à une (ou plusieurs) autre(s) substance (s) antibactérienne (s) auxquelles il n'a pas été exposé ».

⁵ Il est important de noter que ces définitions ne sont pas exclusives et que certaines d'entre elles peuvent être associées afin de mieux préciser la nature de cette résistance.

3 Modes d'action des biocides antibactériens

La grande majorité des biocides antibactériens agissent sur plusieurs cibles compte-tenu de la réactivité chimique de la plupart d'entre eux (tableau 1) (Russell et Chopra 1990, Denyer 1995, Poole 2002).

Cette idée générale doit cependant être nuancée puisque certaines substances actives (ex : triclosan) ont une cible spécifique (Hugo 1967, Russell et Maillard 2000).

Relativement peu de données précises existent aujourd'hui sur le mode d'action des biocides, en particulier lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations faibles, comme par exemple en tant que conservateurs.

L'ensemble des modes d'action d'un biocide antibactérien peut être défini sur la base des structures bactériennes ciblées par les biocides. Ainsi, quatre sites d'action sont décrits dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Les différentes familles de biocides⁶ antibactériens et les structures bactériennes ciblées

Action sur la paroi cellulaire	Action sur la membrane	Action sur les protéines	Action sur les acides nucléiques
Alcools Aldéhydes Bases Phénols	Acides Alcools Ammoniums quaternaires (QACs) Bases Biguanides Isothiazolinones Métaux Oxydants Phénols	Acides Alcools Aldéhydes Bases Biguanides Isothiazolinones Métaux Oxydants Phénols	Acides Alcools Aldéhydes Biguanides Halogènes et dérivés Métaux Oxydants

Ci-après, les substances actives biocides sont présentées par famille, sur la base d'une synthèse non exhaustive de données sélectionnées dans la littérature.

3.1 Les acides

Plusieurs acides sont utilisés pour leurs propriétés antibactériennes. Ils sont utilisés en tant que désinfectant pour l'hygiène humaine en type de produit (TP) TP1 (exemple : acide citrique), pour les surfaces et matériaux hors et en contact alimentaire TP2 et TP4 (exemple : acide lactique), et pour l'hygiène vétérinaire en TP3 (exemple : acide glycolique), mais aussi en tant que conservateur pour la protection des produits dans leur emballage en TP6 (exemple : acide L- (+) - lactique).

Ces acides sont capables de passer à travers la paroi cellulaire des bactéries dans le cytoplasme des cellules sous forme non dissociée. A l'intérieur de la cellule, en raison du pH plus élevé, l'acide se dissocie et le pH diminue alors fortement. Cette diminution de pH se traduit, par exemple, par une inhibition des pompes à protons et l'inhibition de toute une série d'enzymes intervenant dans le métabolisme bactérien provoquant in fine un arrêt de la croissance bactérienne (Alexandre, H.; Mathieu, et Charpentier 1996, Ricke 2003, Stratford et Eklund 2003).

⁶ Certaines substances actives biocides citées dans ce rapport, sont encore en cours d'évaluation dans le cadre du règlement européen Biocides (EU) No 528/2012. Leur approbation pour un TP donné n'a pas été confirmée à la publication de ce rapport. D'autres substances actives ont déjà été approuvées et enfin d'autres encore n'ont pas fait l'objet d'une demande d'approbation.

3.2 Les alcools

Bien que plusieurs alcools se soient avérés d'efficaces antibactériens, l'alcool éthylique (éthanol) et l'alcool isopropylique (isopropanol, propan-2-ol) sont les plus utilisés (Morton 1983) en tant que désinfectant en TP1, TP2 et TP4.

Les alcools ont une activité antibactérienne rapide, à large spectre contre les bactéries sous forme végétative (y compris les mycobactéries) mais ils ne sont pas sporicides. Ils sont cependant connus pour inhiber la sporulation et la germination des spores, mais cet effet est réversible (Trujillo et Laible 1970). Les alcools sont largement utilisés pour l'hygiène des mains et pour la désinfection des surfaces inertes, mais également en concentrations plus faibles comme conservateurs. Ils sont aussi retrouvés en association avec d'autres biocides (McDonnell 1999).

Généralement, l'activité antibactérienne des alcools est significativement plus faible aux concentrations à 50%, optimale entre 60 et 90%, sachant que la concentration usuelle est le plus souvent à 70%. Le mode d'action spécifique des alcools est peu connu, cependant en se basant sur l'efficacité accrue en présence d'eau, il est supposé qu'ils causent des dommages à la membrane et une dénaturation rapide des protéines, suivis d'une lyse cellulaire (Morton 1983, Larson et Morton 1991).

3.3 Les aldéhydes

Les aldéhydes sont utilisés pour leurs propriétés désinfectantes en TP2, TP3 et TP4 (glutaraldéhyde, glyoxal, formaldéhyde) et en tant que conservateur (glutaraldéhyde) pour les produits en TP6, TP11 (protection des liquides utilisés dans les systèmes de refroidissement ou de fabrication) et TP12 (pour prévenir ou lutter contre la formation de biofilms) voire en fluide de thanatopraxie TP22 (formaldéhyde).

A titre d'exemple, le glutaraldéhyde détruit les cellules en croissance active, tandis que l'élimination des spores bactériennes nécessite des durées d'exposition plus longues ou des concentrations de glutaraldéhyde plus élevées. Les cellules bactériennes sont tuées par réticulation avec des amines primaires situées dans la paroi cellulaire des micro-organismes conduisant à une inactivation des enzymes cellulaires. Le glutaraldéhyde semble aussi augmenter l'hydrophobicité de la surface des spores par une interaction extensive (réticulation) sur les couches externes des cellules et des spores. Cela peut rigidifier les couches externes des spores inhibant de ce fait la germination des spores (Power et Russell 1989). Ce mécanisme est appuyé par une étude qui montre que la destruction des spores ne semble pas être due à des dommages à l'ADN (Tennen *et al.* 2000). La cinétique du mécanisme de réticulation est influencée par le pH, le temps de contact, la concentration de glutaraldéhyde et la température.

3.4 Les ammoniums quaternaires (QACs)

Plusieurs substances actives appartenant à cette famille sont utilisées en tant que désinfectant en TP1, TP2, TP3 et TP4, et en tant que produits de protection en TP6, TP11, TP12, et TP13 (protection des fluides de travail ou de coupe).

Les QACs agissent à différents niveaux cellulaires (Tischer *et al.* 2012) :

1. Adsorption et pénétration à travers la paroi cellulaire
2. Effets sur les composants de la membrane cellulaire (lipides et protéines)
3. Désorganisation des membranes cellulaires et, à des concentrations plus élevées, provoquent des fuites avec perte subséquente de matière à faible poids moléculaire
4. Dégradation intracellulaire des protéines et des acides nucléiques
5. Lyse des composants de la paroi cellulaire par libération d'enzymes autolytiques
6. Perte complète de l'organisation structurelle de la cellule

3.5 Les bases

La chaux qui appartient à cette famille, regroupe plusieurs substances actives qui sont approuvées en tant que désinfectant en TP2 et TP3. Le mode d'action de la chaux dolomitique vive (oxyde de calcium et de magnésium) appartenant à cette famille est présentée ci-dessous à titre d'exemple. 4 effets sont observés :

1) Augmentation de l'alcalinité - L'addition d'une quantité suffisante de chaux aux déchets organiques induit une augmentation rapide et soutenue du pH (> 12). La concentration élevée en ions OH⁻ libres entraîne la dénaturation des structures protéiques des micro-organismes telles que la paroi, les enzymes et les organites.

2) Augmentation de l'ammoniac libre / non ionisé (NH₃) - L'activité protéolytique dans la biodégradation de la matière organique entraîne une concentration élevée de composés azotés. Le pH élevé associé à l'activité de la chaux est suffisant pour convertir les ions ammoniums (NH₄⁺) en ammoniac libre / non ionisé (NH₃). Le gaz ammoniac diffuse dans les cellules bactériennes, altérant l'équilibre chimique entre les environnements intracellulaire et extracellulaire et inhibant les fonctions enzymatiques essentielles ce qui provoquerait la mort cellulaire.

3) Augmentation de la température - La chaux calcinée (CaO) et la chaux calcifiée dolomitique (CaO · MgO) réagissent avec de l'eau pour former de l'hydroxyde de calcium et de la chaux dolomitique hydratée (Ca(OH)₂ Mg(OH)₂) dans une réaction exothermique. La température après l'ajout de la chaux vive aux boues d'épuration humides serait comprise entre 45 et 75 °C. Les agents pathogènes sont inactivés lors de l'exposition à la chaleur, qui devrait être supérieure à leur température de croissance optimale pour être efficace.

4) Diminution de la disponibilité en eau et augmentation de la pression osmotique - Lorsque de la chaux vive est ajoutée à de la matière organique humide, l'eau est utilisée dans la réaction pour former la chaux hydratée et une plus grande quantité d'eau s'évapore sous l'augmentation de la température. La teneur en matière sèche (composants solides) des boues d'épuration augmente de 30 à 40% grâce au traitement à la chaux vive. Il en résulte une perte de disponibilité en eau pour les populations microbiennes présentes. Bien que la dessiccation absolue ne se produise pas, l'effet de séchage induit une augmentation de la pression osmotique de l'environnement des microbes, ce qui entraîne une fuite d'eau et une lyse cellulaire (Sawai *et al.* 1995).

3.6 Les biguanides

Un des exemples de substances actives de cette famille utilisée à la fois en tant que désinfectant et conservateur, est le polyhexaméthylène biguanide (PHMB). C'est un antibactérien à large spectre qui agit sur l'enveloppe bactérienne (Kaehn 2010). D'autres travaux ont décrit une action du PHMB sur le chromosome qui conduit à l'arrêt de la réplication (Chindera *et al.* 2016).

3.7 Les halogènes et leurs dérivés

3.7.1 Les composés chlorés

Plusieurs substances actives chlorées (par exemple le chlore actif libéré à partir de l'hypochlorite de sodium ou de l'hypochlorite de calcium) sont utilisées en tant que désinfectants en TP2, TP4 et en TP5 (désinfection de l'eau potable destinée aux hommes et aux animaux), TP11 et TP12. Leur mode d'action n'est que partiellement connu. Ils sont de forts agents oxydants qui détruisent les protéines cellulaires (Bloomfield 1996).

A de fortes concentrations, ils sont aussi sporicides (Bloomfield et Arthur 1992, Russell et Day 1996). Ils agissent en séparant l'enveloppe du cortex, suivi d'une lyse. Des études ont montré aussi que les composés chlorés augmentent la perméabilité de l'enveloppe de la spore (Kulikovsky, Pankratz, et Sadoff 1975).

La chloration est toujours la méthode de désinfection la plus couramment utilisée dans les systèmes de traitement de l'eau et de distribution d'eau potable en raison de son rapport coût-efficacité et de sa simplicité de mise en œuvre. Le chlore est introduit dans les eaux à traiter où il persiste principalement comme HOCl et OCl⁻ (Sharma *et al.* 2016). HOCl réagit avec les anions superoxydes, produisant des radicaux libres (OH.) qui détruisent les structures de la cellule bactérienne par oxydation (Bauer 2013).

3.7.2 L'iode

L'iode est une substance utilisée en tant que désinfectant en TP1, TP3 et TP4. Son action antibactérienne est rapide même à faible concentration. L'iode pénètre rapidement dans la cellule (Chang 1971) et attaque les groupements de protéines, particulièrement les groupements -thiol des acides aminés cystéine et

méthionine.(Kruse 1970, Gottardi 1991). Il agit aussi sur les acides nucléiques et les acides gras. (Apostolov 1980, Gottardi 1991).

3.8 Les isothiazolinones

La famille des isothiazolinones antibactériens comprend cinq dérivés importants :

- Méthylisothiazolinone (MIT);
- Chlorométhylisothiazolinone (C(M)IT);
- Benzisothiazolinone (BIT) ;
- Octylisothiazolinone (OIT);
- Dichlorooctylisothiazolinone (DCOIT).

A titre d'exemple, le C(M)IT/MIT est une substance active biocide utilisée en tant que désinfectant en TP2 et TP4 et en tant que conservateur en TP6, TP11, TP12 et TP13. Son mécanisme d'action comprend deux étapes, la première implique une liaison aux cellules et la seconde une inhibition de la croissance et du métabolisme suivies de dommages irréversibles aux cellules entraînant une perte de viabilité (Williams 2007). L'inhibition de la croissance résulte d'une perturbation des voies métaboliques essentielles de la cellule ; par inhibition des enzymes spécifiques contenant des groupements thiol (Collier *et al.* 1990 (a)) comme les déshydrogénases impliquées dans le cycle de Krebs (acide tricarboxylique) et le transport des électrons (NADH). Les fonctions physiologiques critiques sont rapidement inhibées (synthèses protéiques, respiration et synthèse d'ATP).

Le mode d'action antibactérien du C(M)IT/MIT est similaire aux autres isothiazolones (DCOIT, OIT et BIT) par rapport à l'inhibition enzymatique, à l'inhibition de la respiration, à la vitesse de destruction des groupements thiols et formation de radicaux. Les deux principales différences observées comprennent le taux d'association avec les cellules pour l'OIT et le DCOIT et l'absence de formation de chlorure de thioacycle dans les isothiazolones non chlorées (OIT, BIT) (Collier *et al.* 1990 (b)).

3.9 Les oxydants

Plusieurs oxydants sont utilisés en tant que substances biocides. Deux exemples de substances actives sont cités ci-dessous, le peroxyde d'hydrogène et l'acide peracétique (APA) dont les modes d'action sont développés.

3.9.1 Le peroxyde d'hydrogène

Cette substance active biocide est utilisée en tant que désinfectant en TP1, TP2, TP3, TP4 et TP5 et en tant que conservateur en TP6, TP11 et TP12.

Le mécanisme d'action du peroxyde d'hydrogène décrit par Linley, 2012, par la réaction de Fenton (production du radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ conduisant à l'oxydation de l'ADN, des protéines et des lipides membranaires) ne serait pas le seul mécanisme en jeu et le radical oxydant pourrait être également le radical ferryl formé à partir du fer associé à l'ADN. De plus, des recherches sur l'oxydation des protéines suggèrent que l'oxydation sélective de certaines protéines pourrait se produire et que le peroxyde d'hydrogène en phase vapeur est un oxydant de protéines plus puissant que le peroxyde d'hydrogène en phase liquide.

Son action est plus efficace sur les bactéries à Gram-positif, cependant, à faible concentration et en présence de catalase et de peroxydase, la tolérance au peroxyde d'hydrogène augmente chez les micro-organismes. De fortes concentrations (10 à 30 %) et de long temps de contact sont nécessaires pour une action sporicide. Cependant cette activité augmente significativement en phase gazeuse. H_2O_2 agit comme un oxydant en produisant des radicaux libres ($\text{OH}\cdot$) qui attaquent les lipides, protéines et ADN cellulaire (Russell 1991). Il a été suggéré que son mode d'action cible le groupement sulfhydryle et les doubles liaisons (Block 1991).

3.9.2 L'acide peracétique (APA)

L'APA est utilisé en tant que désinfectant en TP1, TP2, TP3, TP4 et TP5 et en tant que conservateur en TP6, TP11 et TP12.

Le mode d'action de l'APA peut être regroupé en trois mécanismes (Dychdala 1993) :

- Dénaturation des protéines cellulaires et interruption du transport cellulaire ;
- Inactivation des enzymes essentielles au métabolisme cellulaire ;
- Perturbation des membranes cellulaires et de leur perméabilité.

L'APA est plus puissant que le peroxyde d'hydrogène, étant sporicide, bactéricide, virucide et fongicide à de faibles concentrations (0,3%) (Block 1991). L'APA se décompose également en sous-produits (acide acétique et oxygène) mais ces sous-produits étant insensibles à l'action des peroxydases, contrairement au peroxyde d'hydrogène, et restent actifs en présence de charges organiques (Lensing et Oei 1984, Malchesky 1993).

3.10 Les métaux

Les métaux sont utilisés depuis fort longtemps comme agents antibactériens, en particulier l'argent et le cuivre. Les recherches les concernant n'ont été reprises que récemment en raison de la possibilité de fabriquer des nanoparticules métalliques qui semblent plus actives que la forme non nano et de l'émergence de résistance constatée à de nombreux autres agents antibactériens. Ainsi un tout récent éditorial de Turner (2018) décrit l'argent comme une des dernières munitions dans l'arsenal antibactérien (Turner 2018).

L'activité de l'argent semble liée à sa forme ionisée tandis que l'argent métal serait inactif selon la synthèse bibliographique de Maillard et Hartemann 2013 (Maillard et Hartemann 2013 (b)), mais c'est la forme nano qui semble la plus efficace depuis les travaux initiaux de Rhim et al (2006) confirmés depuis par de nombreux auteurs dont Fernandez et al (2010). L'action de l'argent semble porter tant sur la membrane cellulaire en perturbant certains mécanismes que sur des protéines et l'acide nucléique (exemple de l'action antivirale) avec l'intervention de radicaux hydroxyles formés selon la réaction de Fenton lorsque l'environnement chimique est propice (Rhim *et al.* 2006, Fernandez *et al.* 2010).

L'action du cuivre semble utiliser les mêmes mécanismes comme le rapporte la récente synthèse bibliographique de Vincent et al (2018) mais également une action par stress oxydant portant sur des protéines et l'acide nucléique (Vincent *et al.* 2018).

3.11 Les Phénols

Les phénols sont caractérisés par un mécanisme d'action multi-sites (Denyer 1995). Deux exemples de substances antibactériennes appartenant à la famille des phénols sont décrites ci-dessous.

3.11.1 Le triclosan

La cible principale du triclosan est l'ENR [enoyl- (acyl carrier protein) (ou ACP) reductase], une enzyme essentielle à la synthèse des acides gras indispensables et donc des lipides notamment cytoplasmiques. L'ENR est codé par le gène *fabI*. Le triclosan, à faible dose, agit sur l'ENR en s'y fixant et forme un complexe avec une affinité accrue pour le NAD⁺ ce qui conduit à un complexe ternaire empêchant l'action du NADH nécessaire à la synthèse des lipides cytoplasmiques (Hoang et Schweizer 1999).

NB : *Le triclosan n'a pas été approuvé en tant que substance biocide*⁷

⁷ DÉCISION D'EXÉCUTION (UE) 2016/110 DE LA COMMISSION du 27 janvier 2016 n'approuvant pas le triclosan en tant que substance active existante destinée à être utilisée dans les produits biocides du type de produits 1

DÉCISION D'EXÉCUTION DE LA COMMISSION du 24 avril 2014 concernant la non-approbation de certaines substances actives biocides en vertu du règlement (UE) no 528/2012 du Parlement européen et du Conseil (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

3.11.2 Le chlorocrésol (CMK)

Le CMK est une substance active utilisée en tant que désinfectant en TP1, TP2, TP3 et en tant que conservateur en TP6, en TP9 (protection des matières fibreuses ou polymérisées) et en TP13. Il est actif au niveau de la paroi cellulaire, perturbant le potentiel de la membrane et la perméabilité générale de la membrane cytoplasmique. À des concentrations élevées, le CMK a également un effet sur le cytoplasme provoquant une coagulation générale. Le CMK s'adsorbe sur la membrane cellulaire. La fonction des protéines membranaires est ensuite perturbée : le transport des substrats et la synthèse de l'ATP sont inhibés. La membrane cellulaire perd sa semi-perméabilité et les ions et les molécules organiques s'échappent (Denyer 1995). Selon Russell et al (1990), les cibles cellulaires du CMK sont les parois, les membranes et le cytoplasme en fonction de sa concentration d'utilisation (Russell et Chopra 1990).

4 Les mécanismes de résistance aux biocides antibactériens

L'exposition de la bactérie à un produit biocide antibactérien peut constituer un stress qui va provoquer des lésions cellulaires temporaires, structurelles ou fonctionnelles (ADN, ARN, enzymes, ribosomes, membrane). Les réponses au stress visent à réparer ces lésions, à survivre et à s'adapter à la croissance dans les nouvelles conditions environnementales. Ces réponses globales, impliquent le facteur sigma qui induit une expression de différents régulons et des réponses plus spécifiques à tel ou tel type de stress (thermique, osmotique, nutritionnel, chimique).

La résistance des bactéries aux biocides peut être classée en deux catégories : intrinsèque et acquise.

La résistance intrinsèque⁸, est définie comme une propriété déjà existante et inhérente à une espèce donnée, entraînant une baisse de la sensibilité ou une insensibilité au biocide.

Dans le cadre de cette saisine, seuls les phénomènes liés à la résistance acquise sont analysés, puisque celle-ci est susceptible de se développer lors de l'usage de biocides antibactériens et qu'elle doit être évaluée dans le cadre de l'instruction des dossiers substances actives et des dossiers produits biocides.

La résistance est acquise soit par transfert de gènes de résistance lors du contact entre deux bactéries selon un mécanisme principal dit de conjugaison en plus des mécanismes d'expression, de transduction et de transformation, soit par mutation sur le chromosome bactérien de gènes régulateurs (ex *MarA*, *SoxRS*, *OxyR*, *Rob marA* ; *soxR/S* ; *rob* regulon...) (Dukan *et al.* 1996) de l'expression de multiples gènes. Ces gènes régulateurs sont globaux et peuvent entraîner une résistance croisée en réponse à d'autres stress (thermique, osmotique, chimique).

Les principaux mécanismes qui expliquent la résistance acquise des bactéries aux biocides antibactériens sont résumés ci-dessous (figure 1) :

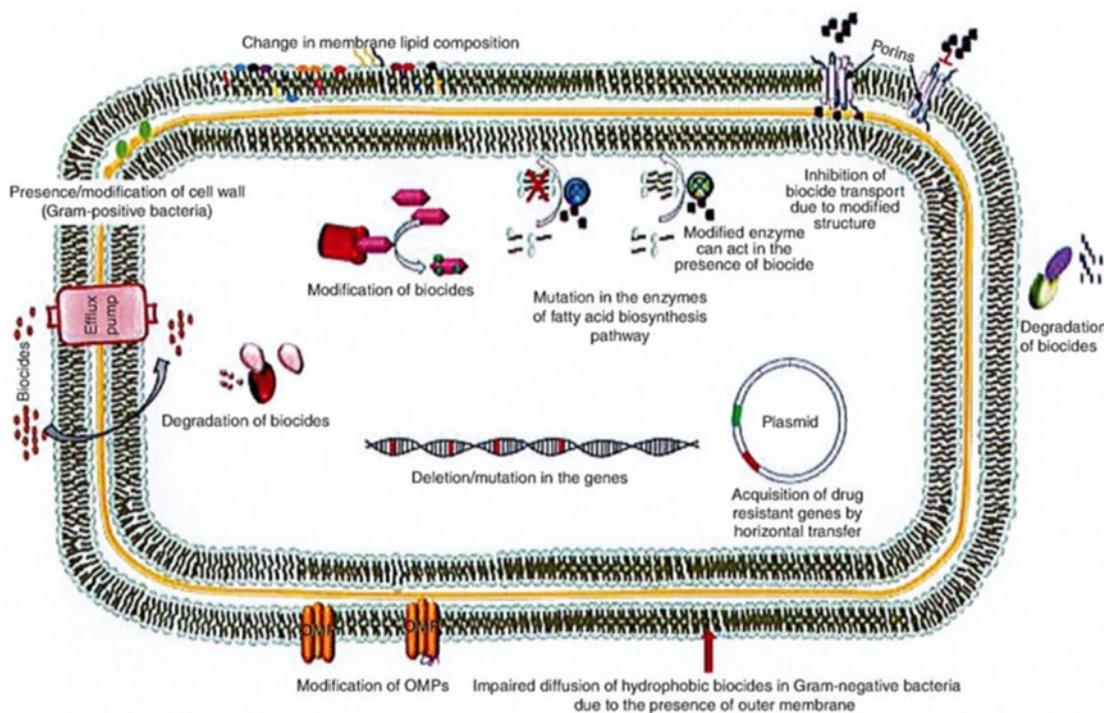


Figure 1 : Les mécanismes de résistance acquise aux biocides antibactériens (Gnanadhas, 2013)

⁸ Définition provenant du Technical Notes for Guidance : « Revision of chapter 6.2 (Common principles and Practical procedures for the Authorisation and Registration of Products) of the TNSG on Product Evaluation, and a revision of Chapter 10¹ (Assessment for the potential for resistance to the active substance) of the TNSG on Annex I Inclusion » (CA-Sept08-Doc.6.2)

4.1 Modulation de l'activité des pompes à efflux

L'utilisation des pompes à efflux par les bactéries est commune autant dans le cas de la résistance naturelle que dans le cas de la résistance acquise. Ces pompes à efflux, fruit de l'expression de gènes, sont portées soit par le chromosome, soit par des éléments génétiques mobiles, et peuvent être communes aux biocides et aux antibiotiques (ex : multi-drug resistance, MDR). Une modulation de l'expression de ces gènes suite à une exposition à certains biocides peut conduire à un accroissement de l'activité des pompes se traduisant par une augmentation aussi bien de la résistance des bactéries aux biocides qu'à certains antibiotiques (Denyer 1995, Poole 2002)

Les substances cationiques (QAC, chlorhexidine) et le triclosan ont été considérés comme des causes possibles de la sélection de souches bactériennes ayant un niveau faible de résistance aux antibiotiques (Russell 2002) et cela pourrait expliquer leur persistance. Il a été suggéré que l'émergence des gènes *qacA* et *qacB* codant pour des pompes à efflux chez des isolats cliniques de *Staphylococcus aureus*, reflète l'introduction et l'utilisation de biocides cationiques (Russell 2002). Si les biocides et les antibiotiques sont éliminés par le même système d'efflux, la résistance à l'antibiotique pourrait se développer en raison de la régulation positive due à l'utilisation de biocides.

4.2 Inactivation du biocide

L'inactivation enzymatique (détoxication) des biocides est un autre mécanisme de protection contre les biocides. Même s'il est moins fréquent, ce phénomène a été observé chez *Pseudomonas*. Certains aldéhydes sont inactivés par la formaldéhyde déshydrogénase, le peroxyde d'hydrogène par la catalase, la superoxyde dismutase et l'alkyl hydroperoxidase, et le triclosan par le noyl- (acyl carrier protein) (ou ACP) reductase (van Klingeren et Pullen 1993, Hay, Dees, et Saylor 2001, Meade, Waddell, et Callahan 2001). *Pseudomonas fluorescens*, isolée d'une usine de traitement des eaux usées, a pu également dégrader le chlorure de didécylidiméthyl ammonium en décylidiméthyl amine et en diméthylamine (Nishihara, Okamoto, et Nishiyama 2000).

4.3 Modification de la cible

L'altération ou la modification de la cible est une autre stratégie par laquelle les micro-organismes acquièrent une résistance aux biocides. La modification due à une mutation dans le génome peut également produire un changement dans la sensibilité aux biocides. Chez *E. coli*, le triclosan inhibe la synthèse des acides gras bactériens en agissant sur FabI (énoyl-acyl réductase). Une mutation dans le gène *fabI* (G93V) confère une résistance de la bactérie au triclosan (Heath *et al.* 1999). De même chez *Mycobacterium tuberculosis* l'analogue de *fabI* (*inhA*) est la cible des antibiotiques isoniazide et éthionamide, ainsi que du triclosan, et une mutation ponctuelle du gène *inhA* (S94A) confère une résistance à l'isoniazide (Banerjee *et al.* 1994).

4.4 Transfert horizontal de gènes

Les gènes de résistance aux biocides peuvent être transférés par des plasmides lesquels peuvent aussi porter ou non d'autres gènes de résistance (métaux, antibiotiques...). Cette résistance est due à des enzymes spécialisées, hydrolases et réductases, situées dans le cytoplasme. La résistance au triclosan chez *S. aureus* est due à l'acquisition de l'allèle *sh-fabI* par transfert horizontal de *S. haemolyticus*. L'îlot *sh-fabI* a été détecté dans un plasmide staphylococcique (condition d'hétérodiploïdie) indiquant un transfert actif d'éléments probablement dû à la sélection positive exercée par le triclosan (Ciusa *et al.* 2012). D'autres travaux montrent que des gènes de résistance aux QACs (*qacA/B*) portés par des plasmides sont communément retrouvés associés à des gènes de résistance à la pénicilline chez des souches de *Staphylococcus aureus* d'origine clinique (Sidhu *et al.* 2002).

4.5 Modifications des propriétés membranaires

La résistance aux agents antibactériens peut être due à un mécanisme d'adaptation de la paroi cellulaire. Pour que ces substances antibactériennes soient efficaces, elles doivent pouvoir pénétrer la paroi cellulaire et atteindre une concentration suffisante pour exercer leur action sur le site cible. Les agents antibactériens

hydrophiles sont empêchés d'entrer à travers la membrane externe par la couche de lipopolysaccharides et les phospholipides sous-jacents, alors que les agents hydrophobes sont exclus par les protéines de la membrane externe que l'on appelle porine.

Des études sur un des mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux isothiazolinones ont montré qu'une protéine de la membrane externe de 35 kDa était présente dans les cellules sauvages (sensibles) et non détectable dans les cellules résistantes. Il a été suggéré que *P. aeruginosa* a développé une résistance aux isothiazolones par un processus d'adaptation suite à la suppression de la protéine de la membrane externe qui est une porte d'entrée des isothiazolones (Brozel et Cloete 1994).

4.6 Adaptation physiologique (phénotypique)

4.6.1 Cas des biofilms : Mécanismes identifiés comme jouant un rôle dans la résistance du biofilm aux biocides

Un biofilm est une communauté de micro-organismes adhérant à une surface et entourée par une matrice complexe constituée d'exopolymères. La persistance de certains micro-organismes suite au traitement biocide est fréquemment observée et il a été conclu que cela peut en partie s'expliquer par la présence de biofilms sur les surfaces.

Dans la plupart des environnements humides, les micro-organismes sont capables d'adhérer à une surface, produisant une matrice d'exopolymères composée principalement d'exopolysaccharides (EPS), de protéines et d'acides nucléiques. Les cellules présentes dans la matrice du biofilm ont la particularité d'exprimer des phénotypes qui diffèrent de ceux de leurs contreparties planctoniques, et d'afficher des propriétés spécifiques incluant une résistance accrue aux traitements biocides (Frank et Koffi 1990, Vilain *et al.* 2004). Au sein d'un biofilm, il va y avoir établissement de gradients chimiques : les cellules situées à la périphérie du biofilm ont accès à des nutriments et à de l'oxygène, tandis que les bactéries présentes dans les couches internes du biofilm sont soumises à des microenvironnements pauvres en nutriments où les concentrations de déchets métaboliques sont plus élevées. Cette hétérogénéité chimique régit l'apparition d'une hétérogénéité physiologique et d'une population physiologiquement hétérogène. Les modifications des taux de croissance et d'activité induisent des changements de la composition de la membrane et l'expression de mécanismes de défense susceptibles d'entraîner une résistance accrue des bactéries aux biocides (Sabev, Robson, et Handley 2006).

L'apparition d'un phénotype spécifique au biofilm s'est révélée être au moins en partie induite par des phénomènes de « quorum sensing ». En effet, la communication de cellule à cellule a été identifiée comme contrôlant le développement du biofilm dans un certain nombre d'espèces bactériennes (Parsek et Greenberg 2000). Des cas d'adaptation de phénotypes spécifiques susceptibles de contribuer à la résistance bactérienne sont observés dans les biofilms où une petite fraction de la population peut entrer dans un état hautement protégé présentant une résistance spectaculaire et appelée persistance (Harrison *et al.* 2005). Ces cellules sont des variants phénotypiques, mais pas des mutants génétiques, et ont également été identifiées dans les populations bactériennes planctoniques. Une des hypothèses est que les cellules « persistantes » se développent plus fréquemment dans un biofilm que dans une culture et contribuent donc à une meilleure protection antibactérienne dans le biofilm (Roberts et Stewart 2005).

De plus, des études démontrent que le stress oxydant induit dans un biofilm par un microenvironnement difficile, peut provoquer l'émergence de variants résistants aux biocides par le biais de l'amélioration via des mutations génétiques. Les transferts de gènes et les mutations jouent un rôle important dans l'émergence de la résistance car il a été démontré que les biofilms peuvent constituer un environnement propice pour l'échange de matériel génétique (Hausner et Wuertz 1999), conduisant à la diffusion de cassettes de résistance aux biocides au sein de la population. En effet, une densité cellulaire élevée, la présence d'une matrice, la libération de grandes quantités d'ADN ou des conditions nutritives dans les biofilms peuvent favoriser les processus de conjugaison et de transformation.

4.6.2 Cas des bactéries intra-protazoaires

Un nombre relativement important de bactéries sont capables de résister à la prédation par les protozoaires, et en particulier les amibes libres, qui s'en nourrissent (Greub et Raoult 2004). Parmi ces bactéries capables

de survivre et de se multiplier dans leurs hôtes amibiens, on trouve des bactéries pathogènes de divers genres *Listeria*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, ou *Legionella* (Greub et Raoult 2004).

La relation entre *Legionella pneumophila* et diverses amibes en particulier a fait l'objet de nombreuses études (Steinert *et al.* 1998, Declerck *et al.* 2007, Newton *et al.* 2010, Hilbi, Hoffmann, et Harrison 2011). Les amibes confèrent une protection aux bactéries qu'elles renferment, par effet « bouclier » exercé par les membranes de l'hôte, vis-à-vis des agressions extérieures au rang desquelles se trouvent les biocides (Greub et Raoult 2004, Loret et Greub 2010). Dans le cas de *L. pneumophila*, il a de plus été montré que les bactéries qui se sont développées dans les amibes sont plus résistantes aux traitements biocides qu'elles soient sous forme planctonique (Barker *et al.* 1992, Dupuy *et al.* 2011) ou incluses dans des vésicules amibiennes (Berk *et al.* 1998). Néanmoins, il peut être considéré dans ce cas particulier que la résistance aux traitements biocides conférée par l'amibe qui les héberge ne rentre pas dans le cadre de l'acquisition des résistances acquises aux produits biocides.

5 Méthodes d'évaluation de la résistance

5.1 Méthodes d'évaluation de la capacité des bactéries à développer une résistance et sa stabilité

5.1.1 Principe des méthodes

L'analyse bibliographique traitant des méthodologies d'évaluation de la résistance des bactéries aux biocides antibactériens, démontre l'existence d'une grande diversité d'approches méthodologiques. Le constat peut être fait que cette variété permet de couvrir la diversité des usages intéressant cette saisine sous réserve d'un choix pertinent de ces méthodes, c'est à dire le plus adapté possible aux conditions d'application.

Avant de détailler cette analyse bibliographique, les différentes approches méthodologiques sont citées ci-après en ne retenant que les grands principes :

- Les méthodes basées sur un contact unique pendant des durées variables, suivies d'une évaluation des CMI avant et après contact, et suivi d'une étude de stabilité après repiquages (assez communément le nombre de repiquages en l'absence de biocides est de 10).
- Les méthodes basées sur les contacts répétés à une concentration constante du biocide, suivies d'une évaluation des CMI avant et après contact, et d'une étude de stabilité des souches adaptées par repiquages dans un milieu de culture exempte de biocide.
- Les méthodes basées sur des contacts répétés à des concentrations croissantes du biocide en partant d'une concentration sub-CMI, suivies d'une évaluation des CMI avant et après contact.

Concernant ces deux dernières approches, le nombre de contacts est variable suivant les auteurs. Il peut être de 4, 7, 10, 15 voire un nombre de contacts plus important encore jusqu'à l'apparition d'un phénomène de résistance de souches bactériennes.

Si un phénomène d'adaptation est observé, ces expérimentations sont suivies d'une évaluation de la résistance croisée aux antibiotiques ou à d'autres substances biocides.

- Les méthodes basées, après contact (s) avec le biocide, sur la comparaison des cinétiques de destruction d'une population donnée de micro-organismes. Ces différences peuvent aussi être exprimées par la valeur de « D », c'est-à-dire le temps nécessaire pour obtenir une réduction décimale d'une population bactérienne donnée. Chez certains auteurs, des études de corrélation entre l'augmentation de CMI et d'éventuelles modifications des cinétiques de destruction sont conduites en complément.
- Les méthodes basées, après contact (s) avec le biocide, sur les différences des courbes de croissances. Dans ces approches, l'élément de comparaison peut être la différence entre les temps de latence précédant les phases exponentielles de croissance.
- Les méthodes basées sur des différences de CMB entre souches adaptées et non-adaptées en appliquant par exemple des tests de base normalisés du CEN/TC 216, type NF EN 1040.
- Les méthodes basées sur des études suivant l'évolution du phénotype de résistance aux antibiotiques dont les résultats peuvent être corrélés avec des résistances à certaines molécules biocides.
- Les méthodes basées sur la détection de gènes de résistances lorsque ceux-ci sont connus. Elles ont des objectifs différents des méthodes précédentes puisqu'il s'agit ici de faire de la surveillance et de suivre, sur des périodes longues de plusieurs mois ou années, la prévalence d'une série de gènes de résistance dans une espèce bactérienne donnée.

Néanmoins, les limites méthodologiques suivantes sont notées :

- Les travaux recensés dans les publications scientifiques sur la résistance aux biocides sont réalisés essentiellement à partir d'expérimentations au laboratoire. Il existe peu d'expériences *in situ* à l'exception, par exemple, des travaux sur des communautés bactériennes issues de siphons d'éviers

de cuisines domestiques qui apportent des informations sur la composition de ces communautés et leur sensibilité à des biocides (McBain *et al.* 2003, McBain *et al.* 2004, Moore *et al.* 2008).

- Le plus souvent un faible nombre de souches bactériennes est étudié ce qui rend difficile l'extrapolation des résultats obtenus en particulier à une espèce bactérienne.
- Enfin, les bactéries peuvent être dans différents états physiologiques et métaboliques (phase exponentielle, stationnaire de croissance, viables cultivables ou non-cultivables) et posséder ou non des mécanismes de résistance (expression de mutations constitutives, surexpression de gènes ...).

Toutes les approches méthodologiques citées ci-dessus ont fait l'objet de travaux scientifiques depuis plusieurs décennies et elles correspondent très majoritairement à des expérimentations menées au niveau du laboratoire. En conséquence, les résultats de ces travaux démontrent que les micro-organismes ont les capacités de s'adapter à un environnement contenant des substances actives ou produits biocides, de façon stable ou transitoire, pouvant aller jusqu'au développement d'une résistance à ces substances actives ou produits biocides, voire une résistance croisée à d'autres biocides ou à des antibiotiques. Ces données de laboratoire ne permettent pas une extrapolation aux situations qui se déroulent sur le terrain, situations extrêmement diversifiées et complexes. En clair, ces données prédictives sont importantes en termes d'alertes mais le risque potentiel devrait être confirmé et validé par la mise en place d'expérimentations et d'enquêtes sur le terrain. Dans cette analyse il est aussi important de noter l'absence de travaux comparant des résultats provenant d'études de laboratoire aux études de terrain.

Deux points importants méritent d'être soulignés :

Le premier point est de considérer que, à côté de la ou des substances actives, d'autres ingrédients parmi les coformulants pourraient contribuer à des phénomènes d'adaptation.

Le deuxième point à considérer est la prise en compte, dans le choix des approches méthodologiques, de la réalité du « terrain » comme le devenir de ces substances et produits biocides à la suite immédiate de leur application. Lorsqu'un produit est appliqué (exemple pour un traitement de surface) dans un environnement donné (hôpital, industries alimentaires, industries pharmaceutiques, canalisations, élevages, milieu domestique, ...) une série d'événements se déroulent pour la substance active et ses coformulants. En effet, au départ une solution est préparée à la concentration d'emploi autorisée, puis lors de son application dans des environnements très complexes et diversifiés cette concentration d'emploi n'est pas en totalité au contact direct des micro-organismes à détruire. Enfin, cette concentration lors de l'étape de rinçage peut évoluer vers des concentrations résiduelles. Tout au long de cette séquence, les micro-organismes cibles (et les autres) sont en présence d'un continuum de concentrations allant de la concentration bactéricide initiale à des concentrations sub-bactériostatiques en passant par une série de concentrations sub-bactéricides, traduisant une série de défauts qui peuvent se produire lors des sous-dosages en produits ou lors d'une élimination incomplète de résidus de biocides.

Deux phases sont classiquement conduites lors de ces expérimentations en laboratoire :

- La 1^{ère} permet d'apprécier la capacité des souches bactériennes d'essais à réagir et à s'adapter à un environnement constitué de biocides.
- La 2^{nde} permet de répondre à la question de la stabilité de l'adaptation, est-elle transitoire, c'est-à-dire disparaissant après élimination du biocide, ou est-elle stable et irréversible se maintenant après élimination du biocide ?

5.1.2 Evaluation de la capacité d'adaptation des bactéries aux biocides

Cette évaluation suppose la mise en place de différentes étapes nécessitant l'emploi de diverses méthodes : une étape d'adaptation, suivie selon les auteurs, d'étapes de détermination de CMI pour les biocides et les antibiotiques, de CMB pour les biocides, de cinétiques de destruction ou de croissance microbienne, ou et de recherche de gènes de résistance.

Principe : un *inoculum* bactérien standardisé est mis en suspension en contact avec une concentration de biocide pendant un temps donné (de quelques minutes jusqu'à 24 h, temps qui doit être mis en relation avec l'usage du produit biocide). Ce contact peut être unique (Whitehead *et al.* 2011) ou répété. Ce mélange est incubé à la température optimale de croissance de la bactérie. A la suite de l'incubation, une partie aliquote du mélange peut être remise en contact avec la même concentration de biocide ou des concentrations croissantes de biocide puis ré-incubée dans les mêmes conditions que précédemment. Cette étape est alors répétée généralement 4 (Christensen, Gram, et Kastbjerg 2011), 7 (Curiao *et al.* 2016), 10 (Winder *et al.*

2000, Forbes *et al.* 2014, Knapp *et al.* 2015) ou 15 fois ou jusqu'à observer une absence de croissance bactérienne après 3 à 7 jours d'incubation (Thomas *et al.* 2000, Braoudaki et Hilton 2005, Capita *et al.* 2014, Gadea *et al.* 2017). A la suite de cette exposition unique ou répétée, les bactéries sont lavées pour éliminer la présence éventuelle de biocide puis stockées dans un milieu de conservation à -80°C avant la mise en place de méthodes de détermination du niveau de résistance, et de la stabilité de cette résistance.

Commentaires : Les expositions répétées à des concentrations sub-CMI réalisées dans les conditions de laboratoire ont pour objectif de simuler des conditions rencontrées sur le terrain lors des étapes de nettoyage et désinfection suivies d'un rinçage suffisant ; en effet l'exposition à des concentrations décroissantes, même si sa probabilité de survenue paraît plus faible, permet de générer des mutations (Maillard *et al.* 2013 (a)).

5.1.3 Evaluation de la stabilité de l'adaptation au biocide

Pour évaluer la stabilité de la capacité d'adaptation au biocide, les bactéries présentant après les essais d'adaptation une diminution de leur sensibilité au biocide et, ou antibiotique révélée par la détermination de la CMI et/ou CMB, sont soumises à des sous-cultures (24 h à 72 h) en absence de pression représentée par le biocide. La sensibilité au biocide et, ou à l'antibiotique est testée pour ces bactéries et comparée aux valeurs trouvées pour les souches adaptées. Le nombre de sous-cultures varie en fonction des travaux : 1, 5, 10 (Knapp *et al.* 2015, Wesgate, Grasha, et Maillard 2016) ou 7 (Soumet *et al.* 2012). Certains travaux font état d'ensemencements sur géloses une fois par mois et testent de nouveau la sensibilité. L'objectif de ces essais est de savoir si l'adaptation se maintient ou disparaît au cours du temps.

Ainsi, des souches d'*Escherichia coli* exposées de manière répétée à différentes substances actives de la famille des QACs ont été démontrées comme résistantes de manière stable à différents antibiotiques (ampicilline, chloramphénicol, fluoroquinolones) (Soumet *et al.* 2012). Des mutants générés suite à l'exposition d'isolats de *Salmonella Enteritidis* pendant 24 h à un produit chloré (25 ppm chlore) et à des conservateurs (acide acétique 0.05%, benzoate de sodium 1% et nitrate de sodium 1%), présentent une augmentation de CMI d'un facteur 2 à 4 à la tétracycline, qui est stable après 10 passages répétés en absence de conservateurs (Potenski, Gandhi, et Matthews 2003). A contrario, l'adaptation n'a pas été démontrée comme étant stable dans d'autres études. Ainsi, un phénotype stable de résistance aux biocides de souches de *Salmonella* Typhimurium n'a pas été retrouvé suite à leur exposition à 7 formulations commerciales biocides (Condell *et al.* 2012). De même, une souche de référence de *Pseudomonas aeruginosa* présente un phénotype de résistance à un QAC non stable passant d'une CMB de 200 à 25 µg/ml après 18 sous-cultures en absence de biocide (Guerin-Mechin *et al.* 1999).

5.2 Méthodes d'évaluation du niveau de résistance

Dans le cadre de cette saisine, l'analyse des usages biocides antibactériens a été déclinée en exemples de grands domaines d'utilisation couvrant globalement 13 types de produits biocides antibactériens (TP1, TP2, TP3, TP4, TP5, TP6, TP7, TP9, TP10, TP11, TP12, TP13 et TP22) figurant dans la réglementation biocides⁹.

Une description de ces exemples de domaines d'utilisation (définitions réglementaires, substances actives les plus rencontrées et liste des méthodes utilisées pour l'évaluation de la résistance dans ces domaines, ...etc) est présentée ci-après.

Cette partie sera suivie d'une description des différentes méthodes utilisées pour l'évaluation du niveau de la résistance pour chacun de ces différents exemples de domaines d'utilisation.

⁹ Annexe 1 : Les principaux types de produits concernés par les travaux de l'autosaisine

5.2.1 Les grands domaines d'utilisation des biocides

5.2.1.1 Produits de traitement des surfaces

Ces produits biocides peuvent être utilisés dans les hôpitaux, dans des industries, à la maison, dans des logements ou véhicules de transport d'animaux, dans des cuisines et autres commerces alimentaires pour désinfecter les surfaces.

Ces différents domaines sont représentés par les types de produit TP2, TP3 et TP4 et appartiennent au groupe principal N°1 des produits biocides (Annexe V du règlement biocide).

Les produits peuvent être appliqués par pulvérisation, essuyage, voie aérienne ou trempage et les surfaces peuvent être lavées ou essuyées après un certain temps de contact.

5.2.1.2 Produits de protection

Les produits de protection (communément appelés « conservateurs »), appartiennent au groupe principal N° 2 des produits biocides (Annexe V du règlement biocide). Ils sont destinés à prévenir le développement microbiologique sur des matériaux, des objets ou dans des systèmes qui serait préjudiciable à leur fonctionnalité. Ils sont représentés par les TP 6, TP7, TP9 et TP13 et couvrent des utilisations très variées comme par exemple la protection des produits manufacturés pendant le stockage (TP6), des pellicules ou revêtements présents sur des surfaces de matériaux ou objets (TP7), des matières fibreuses ou polymérisées (TP9), et des fluides de coupe (TP13).

La présence de micro-organismes peut entraîner la dégradation d'une matrice ou d'un système dans lesquels ils sont présents, en raison de leur activité métabolique (par exemple la corrosion) ou par l'encrassement formant des biofilms. On peut distinguer deux effets suite à un traitement avec un produit de protection (Guidance ECHA-Volume II (parts B+C))¹⁰

- Un effet préventif : ce traitement est destiné à protéger le matériau lui-même contre l'action des micro-organismes en les inhibant sans provoquer leur destruction. Ce traitement peut avoir un effet réversible sur les micro-organismes (par exemple en provoquant un stress ou des dommages aux cellules sans perte totale de viabilité).
- Un effet curatif : l'action curative a pour but de stopper la détérioration microbienne déjà présente, et d'éliminer / réduire les populations de micro-organismes dans les matrices.

5.2.1.3 Produits de traitement des eaux

Le traitement des eaux est classé sous plusieurs types de produits (TP) en fonction de la finalité de l'usage :

TP2 : traitement des eaux de piscines et spas. L'utilisation de produits désinfectants a pour objectif principal de traiter l'eau afin de prévenir la transmission d'agents pathogènes par l'eau entre les utilisateurs de la piscine. Les objectifs secondaires sont de garantir la qualité esthétique d'une piscine (par exemple en veillant à ce que l'eau ne devienne pas trouble par le développement d'algues) et d'éviter la formation de biofilm sur les surfaces de la piscine telles que le sol et les parois ou dans la tuyauterie et le matériel connexe. (Guidance ECHA-Volume II (parts B+C)).

TP5 : traitement de l'eau potable, destinée à la consommation humaine et animale. Ce type de désinfection a pour but de désinfecter l'eau afin de prévenir la transmission des maladies d'origine hydrique par l'eau potable. Les agents pathogènes transmis par l'eau peuvent être des bactéries, des virus, des levures, des spores de champignons ou des protozoaires. Le traitement des eaux avec des biocides ne doit être effectué que pour des raisons spécifiques d'hygiène ou techniques, en limitant l'application au minimum requis pour atteindre l'effet recherché (principe de minimisation) et uniquement dans des conditions optimales pour une efficacité optimale. (Guidance ECHA-Volume II (parts B+C)).

TP11 : traitement de l'eau ou autres liquides utilisés dans les systèmes de refroidissement et de fabrication. Les produits biocides en TP11 sont utilisés par exemple dans le cadre de la préservation des eaux de refroidissement des tours aéroréfrigérantes, des systèmes d'air conditionné ou de pasteurisation pour maintenir ou réduire la population de micro-organismes à un niveau approprié.

10 Guidance on the Biocidal Products Regulation- Volume II Efficacy – Assessment and Evaluation (Parts B+C)

TP12 : traitement de l'eau ou autres liquides pour prévenir ou lutter contre la formation de biofilms des équipements et structures utilisés dans l'industrie, par exemple le bois et la pâte à papier ou les strates de sable poreuses dans l'industrie d'extraction de pétrole.

Ces produits de traitement de l'eau peuvent être ajoutés en continu, par intermittence, par traitement choc, par génération in situ ou à l'aide de systèmes de contrôle automatisés.

Les biocides majoritairement utilisés sont les composés chlorés (chlore libre ou monochloramine), QACs, PHMB...etc.

Du fait de leur très large utilisation, les études de résistance aux produits biocides dans le traitement des eaux destinées à la consommation trouvées dans la bibliographie sont majoritairement focalisées sur les dérivés chlorés.

Les biocides chlorés ont longtemps eu la réputation de ne pas provoquer l'apparition de résistances (Pietersen et Brozel 1995). Néanmoins, de nombreuses études ont montré dès 1997 que des bactéries résistantes à des concentrations variables de chlore pouvaient être isolées à partir de différentes sources d'eau traitée (Mir, Morato, et Ribas 1997).

L'analyse bibliographique a permis d'identifier les méthodologies suivantes : mesure de la cinétique d'inactivation, de l'effet de biocide par cytométrie de flux, de l'effet biocide par diffusion sur disque, de la concentration minimale sélective (CMS)...etc.

Différentes causes à l'origine de ces résistances ont été proposées. Celles-ci peuvent être liées selon les auteurs à des phénomènes d'agrégation des bactéries, à la formation de biofilms (Bridier *et al.* 2012), à la présence d'amibes (pour les bactéries à survie intra-amibienne (Thomas et Greub 2010), legionelles en particulier) ou la résistance directe à des doses importantes de chlore grâce à la production de glutathion (Chesney, Eaton, et Mahoney 1996, Saby, Leroy, et Block 1999).

Les méthodes présentées dans ce domaine portant sur le traitement de l'eau doivent être rapprochées de celles utilisées pour lutter contre les micro-organismes en biofilm. Il est à noter en particulier que les techniciens en charge du traitement de ces réseaux d'eau préconisent d'associer des produits d'élimination des biofilms (détergents par exemple) aux traitements biocides proprement dits.

5.2.1.4 Produits d'hygiène humaine

Les produits d'hygiène humaine appartiennent au TP1. Ils sont appliqués sur la peau humaine, ou sur le cuir chevelu, dans le but principal de désinfecter la zone traitée.

Pour les travaux de la saisine, l'usage de désinfection des mains est pris comme modèle.

Les produits destinés pour l'hygiène des mains sont divisés en plusieurs catégories :

- Lavage hygiénique des mains (savons antibactériens)
- Désinfectant hygiénique (solutions hydroalcooliques)
- Lavage des mains et désinfectant pour les mains à des fins chirurgicales

Les produits pour le lavage des mains sont destinés à être utilisés avec de l'eau et les produits désinfectants pour les mains sont conçus pour être utilisés sans addition d'eau (exemple des solutions hydro-alcoolique ou des lingettes désinfectantes).

Les désinfectants pour les mains peuvent être utilisés dans une grande variété de domaines tels que les hôpitaux et autres établissements de soins de santé, ou encore en industrie, ainsi que dans le domaine privé. (Guidance ECHA-Volume II (parts B+C)).

Il faut d'abord signaler que la recherche bibliographique est compliquée pour les produits d'hygiène des mains par le fait que l'on utilise des dénominations différentes selon les pays pour désigner non pas les « antimicrobial soaps » mais les antiseptiques ou désinfectants, catégories auxquelles sont rattachés les savons antibactériens. Ainsi il est parfois difficile de savoir ce qui ressort des savons et des produits utilisés pour la désinfection des surfaces, des instruments et de la peau saine voire de l'antisepsie qui normalement ne devrait toucher que la peau lésée. Plusieurs titres de publications parlent de savons antiseptiques sans qu'il soit facile de savoir par le titre s'il s'agit de produits pour l'hygiène des mains des personnels ou la préparation de la peau avant intervention chirurgicale ou autre.

Il faut également signaler que la quasi-totalité des articles retrouvés sur cette thématique datent d'avant 2010, ce qui rend les synthèses effectuées pour le comité SCENHIR de 2009 et 2010 toujours d'actualité.

On peut expliquer ceci par le fait que l'usage des solutions hydroalcooliques (SHA) a largement pris le dessus sur l'usage de savons antibactériens et que, pour le moment, il ne semble pas avoir été mis en évidence une résistance microbienne suite à l'utilisation des SHA.

La méthodologie unanimement employée pour tester la résistance des micro-organismes est la méthode basée sur les CMI.

Il apparaît que le triclosan est, de loin, le biocide le plus étudié quant à son aptitude potentielle sinon démontrée d'avoir un impact sur la résistance antibactérienne (Aiello et Larson 2003) En octobre 2005, le « comité consultatif sur les médicaments sans ordonnance de la FDA » a lancé la discussion sur les bénéfices et risques potentiels associés aux produits « antiseptiques » vendus pour un usage de consommation courante tels que les savons étiquetés comme savons antibactériens. Cette étude portant sur 27 articles publiés sur ce sujet entre 1980 et 2006 (Aiello, Larson, et Levy 2007) conclut de ces articles qu'il n'y a pas de bénéfice associé à l'usage de triclosan dans les savons antibactériens par rapport aux savons classiques pour la population générale alors qu'il y a un risque de sélection de résistance. Par la suite, une revue sur l'efficacité du triclosan utilisé dans les savons antibactériens et son potentiel lié au développement de la résistance aux antimicrobiens, indique que des études de laboratoire n'ont pas montré une différence significative d'efficacité par rapport aux savons exempt d'antibactériens et, la résistance au triclosan et la résistance croisée à d'autres agents antibactériens a été démontrée, bien que le taux de résistance reste faible. Cependant, sur la base des preuves disponibles, le risque de développement de résistance aux antibactériens l'emporte sur le bénéfice de l'utilisation de savons antibactériens contenant du triclosan (Giuliano et Rybak 2015).

De plus dès 2001, Levy attirait l'attention sur le fait que des souches avec une sensibilité réduite au triclosan pourraient être plus difficiles voire impossibles à éliminer par l'usage à domicile de savons contenant du triclosan (Levy 2001) et les études réalisées ensuite sur volontaires n'ont jamais pu montrer de différence d'efficacité dans l'élimination de la flore manuportée par l'usage de savon au triclosan par rapport à un savon sans agent antibactérien. Il peut par ailleurs être noté que toutes ces études utilisent la méthode des CMI et que les CMI des souches avec une sensibilité réduite sont comprises en général entre 1 et 25 mg/mL tandis que la gamme des concentrations d'usage va de 2 à 20 mg/mL.

5.2.1.5 Traitement des biofilms

Les biofilms sont récalcitrants au traitement par des biocides en raison de mécanismes de tolérance multiples (résistance phénotypique). Cela provoque alors la persistance de biofilm malgré l'exposition aux biocides, ce qui prédispose au développement d'une résistance aux antibiotiques (résistance génétique). Comprendre l'interaction entre les mécanismes de résistance phénotypiques et génétiques agissant sur les biofilms, ainsi que la diversité des conditions environnementales influençant l'effet des biocides sont nécessaires pour optimiser la lutte contre les biofilms et éviter dans la mesure du possible le développement de résistance.

Du fait de la complexité d'un biofilm, l'analyse de la bibliographie montre que les méthodes permettant de déceler une adaptation ou une résistance de bactéries suite à l'action d'un biocide antibactérien au sein d'un biofilm sont différentes des autres domaines d'utilisation préalablement identifiés. L'ensemble de ces méthodes sont décrites dans le chapitre 5.2.3.

5.2.2 Méthodologies d'évaluation du niveau de résistance microbienne aux biocides antibactériens concernant les produits de traitements de surfaces, les produits d'hygiène humaine, les produits de traitement des eaux et les produits de protection

La recherche bibliographique fait état de méthodes d'évaluation similaires pour les différents domaines d'utilisation. Un panel de tests a été identifié dans la bibliographie comme CMI, CMB, détection de gènes de résistance, cinétique de croissance et de destruction... etc.

Cependant, les travaux qui concernent ces domaines d'utilisation sont pour la plupart réalisés au laboratoire. En effet, la recherche bibliographique décrit peu de travaux sur le terrain afin de démontrer une adaptation voire une résistance suite à l'utilisation de biocides antibactériens.

Ces études de laboratoire sont majoritairement réalisées avec des QACs, chlorhexidine, chlore, triclosan...etc. Le choix de ces substances est sans doute lié à leur large utilisation.

Ci-après une description des différentes méthodes présentes dans la littérature scientifique, les plus communément rencontrées, permettant d'identifier un phénomène d'adaptation ou une résistance suite à l'action d'un biocide antibactérien pour les différents domaines cités ci-dessus :

5.2.2.1 Détermination de CMI des biocides

Elle consiste à incuber un *inoculum* bactérien standardisé en présence d'une gamme de concentrations de biocides (dilutions le plus souvent d'un facteur 2) pendant 24 à 48 h à la température optimale de croissance de la bactérie. A la suite de cette incubation, la CMI est déterminée. Elle correspond à la plus faible concentration de biocide pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu. Elle est réalisée en milieu gélosé ou le plus souvent, en milieu liquide. Pour l'analyse d'un grand nombre de souches bactériennes, la réalisation en microplaque (96 puits) est privilégiée par rapport aux tubes à essais. Il est important de souligner qu'il n'y a pas de norme pour la détermination de la sensibilité aux biocides mais les conditions expérimentales s'appuient le plus souvent sur celles décrites pour la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques (CLSI, ISO20776 – (Knapp *et al.* 2015)). L'essai est classiquement répété au moins 2 fois à des jours différents. Cette méthode permet de caractériser la sensibilité de la bactérie au biocide.

Interprétations : La bactérie est dite « résistante » au biocide selon les publications :

- Lorsque la CMI du biocide est augmentée d'un facteur au moins 4 par rapport à la CMI initiale (Cowley *et al.* 2015), compte- tenu de l'incertitude de la mesure (variation biologique et technique) qui est estimée de plus ou moins une dilution d'un facteur 2.
- Lorsque la CMI du biocide est supérieure à un seuil épidémiologique de résistance (ECOFF), qui est différent du seuil de résistance clinique (Lavilla Lerma *et al.* 2015). Ce concept de seuil a été défini par le consortium Biohypo (Morrissey *et al.* 2014) et repose sur la distribution normale des CMI d'une espèce bactérienne donnée. Toutes les bactéries qui ont une CMI à l'intérieur de la distribution sont considérées comme sauvages (WT : wild type) c'est-à-dire sensibles et celles qui ont des CMI supérieures à une valeur seuil sont résistantes. Quand la distribution des CMI est unimodale, le seuil est défini comme la valeur pour laquelle au moins 99.9% de la population bactérienne est inférieure à cette valeur (Morrissey *et al.* 2014). Quand la distribution des CMI est bimodale, le seuil est situé entre les 2 populations bactériennes (Morrissey *et al.* 2014). La prise en compte de ce seuil nécessite qu'il soit connu et par conséquent que des études de sensibilité sur un grand nombre de souches de l'espèce bactérienne et du biocide étudié aient été préalablement réalisées. De tels seuils ont été déterminés pour une diversité d'espèces bactériennes à Gram-positif et Gram-négatif (Morrissey *et al.* 2014, Lavilla Lerma *et al.* 2015).

Même si aucune évolution de la sensibilité au(x) substance (s) active (s) biocide(s) n'est observée pour une souche bactérienne, cela ne signifie pas qu'il n'y ait pas une augmentation de la résistance vis à vis d'antibiotiques, voire d'autres biocides. Ainsi dans les travaux sur la décontamination de viandes de volailles, parmi 5 agents décontaminants testés, Alonso-Hernando *et al.* (2009) ont trouvé une évolution de la CMI de ces agents pour seulement le chlorite de sodium acidifié (augmentation d'un facteur 2.1 à 2.6) alors qu'une évolution de la sensibilité des bactéries exposées aux antibiotiques est observée (Alonso-Hernando *et al.* 2009).

D'autres études relatives à la résistance aux désinfectants appliqués sur des surfaces ou du matériel utilisent en général la méthodologie de repiquage des bactéries survivantes en présence de concentrations croissantes de désinfectants. Ainsi, *Pseudomonas aeruginosa* exposée au chlorure de benzalkonium montre une adaptation pour survivre mais aussi une augmentation de l'adaptation concomitante à la ciprofloxacine et aux autres quinolones (Mc Cay, Ocampo-Sosa, et Fleming 2010). La raison en serait à la fois les mécanismes d'efflux et une résistance spécifique aux fluoroquinolones de troisième génération. Une étude portant sur 700 souches de bactérie à Gram négatif montrait que le pourcentage le plus élevé de souches « résistantes » est obtenu avec les trois substances antibactériennes le cétrimide, la chlorhexidine et le chlorure mercurique (Maris 1991). Il semble que 25 ans plus tard les bacilles à Gram négatif et les désinfectants mis en évidence dans ce travail, en plus du triclosan, restent les cibles principales de ce phénomène de résistance aux antibiotiques et aux désinfectants.

Pour le domaine de l'hygiène humaine, en fonction des études, la méthode utilisée pour déterminer les CMI varie quelque peu dans ses modalités pratiques mais pas sur son principe qui reste toujours identique. Les publications américaines ont tendance à se référer aux « guidelines du CLSI ¹¹ » par la méthode des dilutions dans du milieu de Mueller-Hinton, tandis que les publications européennes font plutôt référence à Barry et al (Barry et Brown 1999). Le principe reste toujours identique, seules quelques conditions expérimentales sont différentes, sans probable grande incidence sur le résultat. En effet, si l'on peut observer des augmentations de CMI de 2 à 8 entre souches sensibles et moins sensibles, sur le terrain on utilise souvent des concentrations en désinfectants 100 à 1000 fois supérieures (Maillard 2007).

Des travaux soulignent que la réalisation de la méthode CMI utilisant des courbes de survie est chronophage et n'est que rarement employée. Un exemple de l'emploi de cette méthodologie peut être trouvé dans des travaux où il y a utilisation d'un appareil « Bactometer » pour suivre la cinétique par la variation des propriétés électrolytiques du milieu de culture (Ferrarese, Paglia, et Chirardini 2003).

Payne *et al* ont également utilisé cette méthodologie et font remarquer que dans les normes standards telles que les normes du CEN /TC 2016¹², il y a une grande marge de sécurité pour déterminer l'efficacité des biocides puisque les quantités d'inoculum sont élevées (de l'ordre de 10⁷ cellules par mL), ce qui expliquerait que l'on ne trouve que rarement des différences significatives entre la résistance des souches tests et des isolats cliniques ou environnementaux (Payne, Babb, et Bradley 1999).

5.2.2.2 Evaluation de l'apparition de résistance par CMS

Dans un article récent (Khan, Beattie, et Knapp 2017) est décrite une méthode de sélection de bactéries résistantes à un traitement biocide par mesure de la CMS.

L'hypothèse est qu'à une concentration sub-inhibitrice (inférieure à la CMI de la souche sensible) d'un biocide (ici le chlore libre et la monochloramine), une bactérie résistante aura un taux de croissance supérieur à celui d'une bactérie sensible (voir Figure 2). Une telle sélection de souches résistantes par traitement sub-inhibiteur de chlore a déjà été montrée auparavant sur un *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistant (Shrivastava *et al.* 2004).

En appliquant ce principe, en cultivant des bactéries prélevées sur le terrain, dans un milieu contenant une gamme de concentrations en biocide inférieure à la CMI de la souche sensible, les auteurs ont sélectionné des bactéries résistantes à ce biocide, à l'exception des *Bacillus*, pour lesquels les concentrations de biocides utilisées étaient trop élevées. Les auteurs proposent donc que par cette méthode, on puisse montrer un phénomène de résistance. Dans ce cas, les bactéries résistantes sont sélectionnées et non pas obtenues par adaptation au milieu.

Cette méthodologie pourrait être utilisée pour mettre en évidence une résistance à un biocide donné en cultivant un panel de bactéries représentatives en présence de concentrations variables de ce biocide (comme indiqué dans (Shrivastava *et al.* 2004). Les bactéries les plus résistantes sont sélectionnées à partir des concentrations les plus élevées (CMI/2 pour *P. aeruginosa*).

¹¹ <https://clsi.org/>

¹² Technical Committee « Chemical Disinfectants and Antiseptics »- European Committee for standardization

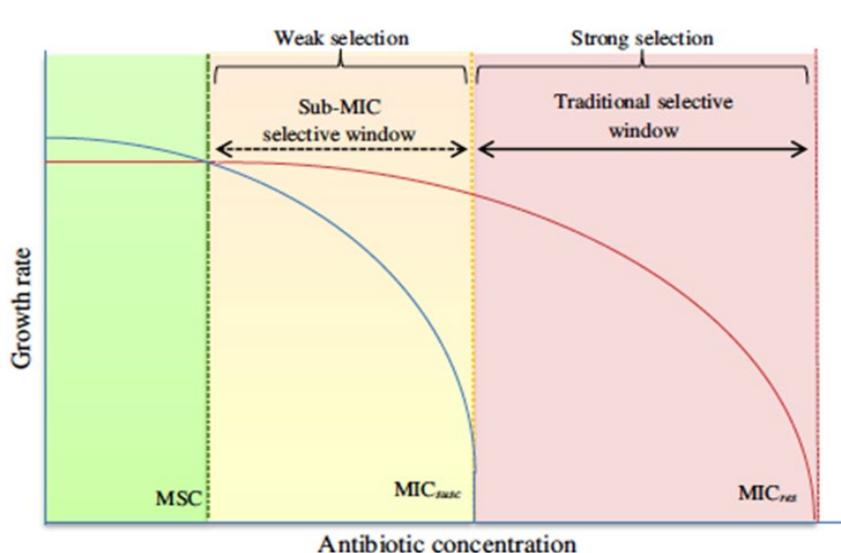


Figure 2 : Représentation schématique des taux de croissance en fonction des concentrations d'antibiotique. CMI sens (ligne bleue) des souches sensibles. CMI res (ligne rouge) des souches résistantes (Gullberg *et al.* 2011, Sandegren 2014).

à la température optimale de croissance de la bactérie. Dans les essais de dilution, les bactéries sont soumises à essai afin de déterminer leur capacité à produire une croissance visible sur une série de boîtes de géloses (dilution en gélose) ou dans un bouillon (dilution en bouillon) contenant des dilutions en série d'antibiotique. A la suite de cette incubation, la CMI est déterminée.

La sensibilité aux antibiotiques peut être également déterminée en déposant sur une gélose ensemencée par une suspension bactérienne un disque chargé d'une concentration donnée d'un antibiotique (Knapp *et al.* 2015, Weggate, Grasha, et Maillard 2016, Fernandez Marquez *et al.* 2017). Après incubation pendant une période définie, une zone d'inhibition autour du disque se développe qui est d'autant plus importante que la bactérie est sensible à l'antibiotique (Kirby-Bauer¹³).

Lorsque la bactérie est résistante, aucune zone d'inhibition n'est observée. Cette méthode peut permettre de faire une première sélection de souches selon leur phénotype avant de tester de manière plus exhaustive leur sensibilité à un grand nombre d'antibiotiques à l'aide par exemple d'une méthode en microplaques.

5.2.2.4 Mesure de l'effet de biocides par diffusion sur disques

Une méthodologie de mise en évidence de souches résistantes à deux biocides utilisés dans le traitement de l'eau potable en Ecosse, chlore libre et monochloramine, est décrite dans un article de 2016 (Khan, Beattie, et Knapp 2016) :

Ces travaux ont été réalisés sur des bactéries issues de prélèvements d'eau potable dans différents bâtiments, pourvus ou non d'une citerne de stockage. La méthodologie utilisée est proche de la CMI employée pour détecter les résistances aux antibiotiques, donc aisément mise en œuvre dans un laboratoire de bactériologie et pourra donc être transposée à des tests sur un panel de bactéries représentatives. Cinquante-deux échantillons d'eau du robinet ont été recueillis puis filtrés (100 mL) sur 0,22 µm et les filtres déposés sur gélose. Les colonies isolées après 48 h à 35 °C ont été identifiées par séquençage ARNr-16S et testées pour leur sensibilité aux biocides. Les tests sont réalisés selon la méthode de diffusion sur disque.

Cette méthode a été validée en utilisant un test de sensibilité au chlore et à la monochloramine de certaines souches choisies en fonction de leur résistance en suspension. Pour cela, les bactéries à 10⁵ d'Unités Formant Colonies (UFC)/ml final ont été incubées dans des solutions de concentrations croissantes de

¹³ Clinical and Laboratory Standards Institute, C, 2012a. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eleventh Edition. In: CLSI Document M02-A11, vol. 32, No. 1. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, pp. 1e76

chacun des biocides et dénombrées après 0, 15 et 60 minutes. De façon prévisible, pour le chlore, les résultats obtenus montrent que les bactéries les moins sensibles en test sur disque sont également les moins sensibles en suspension.

5.2.2.5 Détermination de la CMB aux biocides

1^{ère} approche : Le test de détermination de la CMB est basé sur des essais normatifs (ex : les normes du CEN /TC 2016) (Knapp *et al.* 2015). Il consiste en la mise en contact d'un *inoculum* bactérien standardisé en présence de dilutions incrémentielles de biocide pendant un temps donné (de 30 secondes à 60 min). L'activité microbicide du biocide est arrêtée par l'ajout de neutralisant et les bactéries viables cultivables sont dénombrées sur des milieux gélosés. Le test normalisé est réalisé en tube mais peut être adapté en microplaque. De nombreuses normes européennes sont publiées au niveau du CEN/TC 216, reprenant ce principe général mais aussi tenant compte de diverses conditions pratiques (temps de contact, températures, matières interférentes, supports, ...).

2^{nde} approche : A partir des essais réalisés pour la détermination de la CMI aux biocides, les microcupules ne présentant pas de croissance ainsi que celles relatives aux 2 concentrations les plus faibles de biocide pour lesquelles une croissance bactérienne est visible sont additionnées à du bouillon de culture contenant du neutralisant. Après une période d'incubation de 24 à 48h, la CMB est définie comme la plus faible concentration de biocide à laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée. Cette approche qui est similaire à la méthode appliquée pour les antibiotiques est principalement réalisée en microplaques (Wesgate, Grasha, et Maillard 2016).

5.2.2.6 Cinétique de croissance ou de destruction

A côté des tests de CMI et CMB qui sont souvent employés dans les publications, il y a des tests basés sur la cinétique de croissance (Moretro *et al.* 2017) ou de destruction bactérienne (Er *et al.* 2014, Capita *et al.* 2014). La cinétique est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre au cours du temps pour caractériser la résistance aux biocides. Ainsi, les travaux de Møretrø, Schirmer, et al. (2017) montrent que des souches de *Listeria monocytogenes* porteuses d'un gène de résistance aux QACs (*qacH*, *brcA*) ont une croissance plus rapide en présence de faibles concentrations de biocides que les souches non porteuses de ces gènes. La présence de ce gène peut ainsi représenter un avantage sélectif si des résidus de biocides désinfectants à base de QACs sont présentes sur des surfaces alimentaires après les opérations de nettoyage et désinfection du fait d'un rinçage insuffisant (Moretro *et al.* 2017). A l'inverse, des mutants d'une souche de *Salmonella* Typhimurium (SL1344) résistants à des antibiotiques récoltés après un contact unique (Whitehead *et al.* 2011) ou des contacts répétés (Webber *et al.* 2015) à des doses d'emploi de quatre formulations biocides, (une formulation à base d'aldéhyde et QACs, la seconde contient des QACs, la 3^{ème} à base d'un oxydant et la 4^{ème} contient un amine quaternaire halogéné), croissent moins rapidement que les souches non exposées illustrant donc un coût biologique de l'acquisition de résistance (mutation) par la souche de *Salmonella*. Par contre, après une exposition répétée à ces mêmes biocides mais à des concentrations faibles, la cinétique de croissance est identique aux souches parentales pour des mutants de *Salmonella* Typhimurium résistants à des antibiotiques obtenus (Webber *et al.* 2015). Le paramètre considéré dans ces expériences est le temps de latence. Cette approche permet de suivre facilement l'évolution de la croissance bactérienne à l'aide d'un lecteur de microplaque thermostaté. Dans d'autres travaux, Irizarry et al. (1996) ont comparé les différences de croissance de *Staphylococcus aureus* en présence de chlorhexidine sur des temps de contact allant de 0 à 4 h (Irizarry *et al.* 1996).

En ce qui concerne les essais de cinétique de destruction bactérienne, ils sont basés sur le dénombrement des bactéries à partir de plusieurs prélèvements réalisés au cours du temps. Ils sont plus lourds techniquement à mettre en œuvre puisque des dénombrements sur des boîtes de gélose sont généralement réalisés. Selon cette approche, Haley et al. (1985) ont suivi l'augmentation du temps de survie pour une réduction de 2 log₁₀ en testant le comportement de 3 souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM) vis-à-vis de la chlorhexidine, du chloroxylenol et de l'hexachlorophène. Des augmentations allant de 15 à 240 secondes ont pu être observées (Haley *et al.* 1985). Les travaux de Mir et al. (1997) comparent également les cinétiques d'inactivation de bactéries à Gram-positif et Gram-négatif par le chlore (Mir, Morato, et Ribas 1997).

Cette méthode est utilisée aussi pour évaluer le niveau de résistance des bactéries dans l'eau. Ainsi Mir et al ont exprimé l'efficacité d'action du chlore par la constante d'inactivation K_i (concentration en chlore pour laquelle le taux de décroissance bactérienne est la moitié du maximum). Ce test a été appliqué à une collection de bactéries diverses isolées à différents niveaux d'installations de traitements d'eau (Mir, Morato,

et Ribas 1997). Dans ces deux études précédentes, les effets des biocides ont été mesurés par dénombrement UFC.

Une alternative a été mise en place par Mazzola et al (Mazzola, Martins, et Penna 2006) qui ont évalué l'effet de divers biocides (acide citrique, acide chlorhydrique, éthanol, soude, hypochlorite de sodium et mélange peroxyde d'hydrogène – APA). Ces biocides ont été appliqués chacun à une dose unique sur une collection de bactéries aquatiques isolées d'un système de traitement d'eau ou sur des souches de références de collection. Ces auteurs ont exprimé l'effet des biocides en fonction du temps de traitement nécessaire pour inactiver 90% d'une population bactérienne - temps de réduction décimale : valeur D). Ce temps varie d'une souche à l'autre en fonction de son niveau de résistance.

5.2.2.7 Détection de bactéries résistantes aux biocides par cytométrie de flux

La cytométrie en flux est utilisée dans les travaux de Whitehead et al. (2011) pour mettre en évidence différentes sous-populations (vivantes, mortes) et séparer des mutants d'une souche de *Salmonella* Typhimurium résistantes à des antibiotiques. Une unique exposition à quatre formulations biocides, (une formulation à base d'aldéhyde et QACs, la seconde contient des QACs, la 3^{ème} à base d'un oxydant et la 4^{ème} contient un amine tertiaire halogéné), a permis de récolter des *Salmonella* résistantes à des antibiotiques, mutées au niveau de gènes codant pour des pompes à efflux (Whitehead *et al.* 2011). En parallèle, des méthodes classiques de culture appliquées n'avaient pas permis de détecter dans ces mêmes conditions des mutants, soulignant ainsi le potentiel de la cytométrie pour identifier et sélectionner des mutants qui apparaissent avec une très faible fréquence. Par ailleurs, une exposition unique à de faibles concentrations de ces mêmes biocides (2 à 4 CMI) n'a pas produit de mutant, ce qui confirme de précédents résultats qui indiquent que plus d'une exposition à un faible niveau de concentration de biocides est nécessaire pour sélectionner des mutants résistants à des antibiotiques.

Dans une étude récente (Di Cesare *et al.* 2016), les auteurs ont utilisé les marqueurs fluorescents SYBR green et iodure de propidium afin de déterminer l'efficacité *in situ* de ces traitements sur des bactéries isolées de trois installations de traitement des eaux. La méthode apparaît sensible et efficace et a permis de montrer que l'agrégation des bactéries leur permet non seulement de se protéger des divers traitements mais également de sélectionner des bactéries résistantes aux antibiotiques.

5.2.2.8 Détection de gènes de résistance aux biocides

L'adaptation des bactéries suite à leur exposition aux biocides peut être expliquée par une surexpression de gène(s) de résistance à des biocides (pompes à efflux : *QacA/B*, *Smr*, *AcrAB-TolC*, *NorA*...). Si la séquence nucléotidique des gènes de résistance ciblés est connue, il est possible de quantifier et comparer par RT-PCR l'expression génique des bactéries adaptées versus non adaptées à partir d'extraits d'ARN. Dans plusieurs travaux (Fernández-Fuentes *et al.* 2014, Moretro *et al.* 2017), les gènes de résistance sont détectés par PCR chez les bactéries exposées aux biocides : *qacH* et *bcr* (Moretro *et al.* 2017) chez *Listeria monocytogenes*, *qacA*, *smr*, *efA*, *efB* chez des bactéries à Gram positif (Fernández-Fuentes *et al.* 2014) et également *qacA/B*, *qacEΔ1*, *acrA*, *mdfA* chez différentes espèces bactériennes (Fernández-Fuentes *et al.* 2014).

Il est également possible de mettre en évidence une activité de pompes à efflux chez les bactéries ayant subi une adaptation par la réalisation d'essais de CMI en présence d'inhibiteurs de pompes à efflux. Dans ces conditions, si les pompes à efflux sont impliquées dans le phénomène de résistance il est attendu en présence de l'inhibiteur une sensibilité au biocide quasi-équivalente à celle de la souche non exposée (Fernández-Fuentes *et al.* 2014). Il est important de souligner que les risques de dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques suite à une exposition aux biocides sont élevés lorsque ces gènes sont portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons).

Par ailleurs, cette recherche de gènes de résistance a été régulièrement exploitée par divers auteurs afin de surveiller l'évolution de la résistance de bactéries aux biocides. Citons quelques exemples : suivi de gènes de résistance aux désinfectants (*qac A/B*, *smr*, *qac G*, *qac J*) chez des staphylocoques à partir de lait de bovin et caprin (Bjorland *et al.* 2005) – Présence de *qac A/B* dans 80% de souches de SARM au Brésil (Miyazaki *et al.* 2007) – Recherche de gènes *qac A* et *qac B* dans 522 souches cliniques dans les hôpitaux japonais (Alam *et al.* 2003) – Recherche de gènes *qac* et *smr* dans 894 isolats de MRSA prélevés dans 11 pays asiatiques (Noguchi *et al.* 2005) – Recherche de gènes *qac A/B*, *qac H*, *nor A*, *smr*, *blaz* dans 120 isolats cliniques de SARM (Vali *et al.* 2008).

Cette méthode a été aussi décrite dans l'étude de Chao en 2013, qui a évalué par analyse métagénomique les variations de composition des populations microbiennes dans une installation de traitement d'eau potable

en Chine. L'étude a été réalisée par séquençage « Illumina » sur des prélèvements d'eau avant et après traitement au chlore dans l'installation et analyse bioinformatique des séquences obtenues afin d'identifier les genres bactériens présents et détecter les gènes de résistance aux antibiotiques et gènes de synthèse du glutathion qui permettent aux bactéries de résister au stress oxydant. Les résultats ont ensuite été validés par PCR quantitative et ont notamment confirmé le lien entre bactéries résistantes au traitement et production de glutathion (Chao *et al.* 2013).

5.2.3 Méthodologies spécifiques aux biofilms

5.2.3.1 Méthodologies d'évaluation du niveau de résistance microbienne aux biocides antibactériens- Biofilms

Contrairement aux cellules planctoniques pour lesquelles plusieurs normes bien définies ont été publiées (ex : les normes du CEN /TC 2016), il existe peu de méthodes standards pour évaluer la sensibilité aux biocides désinfectants de cellules bactériennes au sein de biofilms. Les méthodes les plus communément employées sont les suivantes (test Concentration Minimale Eradication du Biofilm (CMEB) et détermination des valeurs Rc / Rt) :

5.2.3.1.1 Test CMEB

Les protocoles standards pour les cellules planctoniques peuvent être adaptés ou des systèmes spécialement conçus peuvent être utilisés, tels que le système d'essai CMEB qui a récemment été approuvé comme méthode standard ASTM (nun. E2799-11)¹⁴ de référence pour déterminer la concentration minimale en biocide pour l'éradication du biofilm. Il existe une multiplicité des définitions pour une même technique, ainsi cette méthode est également reportée sous l'appellation « CMI du biofilm » correspondant à la sensibilité au biocide des bactéries libérées par le biofilm.

5.2.3.1.2 Rc et Rt

La résistance des cellules présentes au sein d'un biofilm peut être évaluée en mesurant le rapport des concentrations (Rc) ou des temps (Rt) requis pour obtenir la même réduction dans la population de plancton ou de biofilm, ou en comparant les réductions obtenues après exposition à la même concentration sur le même période de temps.

Ainsi, $R_c = C_{\text{biofilm}} / C_{\text{planctonique}}$,

C_{biofilm} : concentration en biocide nécessaire pour tuer un niveau donné de cellules de biofilm.
C_{planctonique} : concentration en biocide nécessaire pour tuer le même niveau de cellules planctoniques.

$R_t = T_{\text{biofilm}} / T_{\text{planctonique}}$

t_{biofilm} : temps d'exposition du biocide à une concentration fixe nécessaire pour tuer un niveau donné de cellules de biofilm.

t_{planctonique} : temps d'exposition du biocide à une concentration fixe nécessaire pour tuer le même niveau de cellules planctoniques.

Des exemples de valeurs Rc ou Rt trouvées dans la littérature pour les biocides couramment utilisés sont présentés dans le tableau 2. En fonction des micro-organismes et des biocides considérés, ces valeurs peuvent aller de 1 à 1000 et de 20 à 2160 pour les coefficients Rc et Rt, respectivement, soulignant ainsi le niveau potentiellement élevé de résistance des biofilms à différents biocides désinfectants. Il convient de noter qu'il est souvent difficile de comparer les résultats entre les études en raison de l'absence de protocoles normalisés pour les essais de biocides sur les biofilms.

Tableau 2: Exemples de coefficients de résistance des cellules de biofilm par rapport aux cellules planctoniques en présence de désinfectants couramment utilisés (Bridier *et al.* 2011).

Biocide	Souche	Rc	Rt	Références
---------	--------	----	----	------------

¹⁴ Standard Test Method for Testing Disinfectant Efficacy against *Pseudomonas arruginosa* Biofilm using the MBEC Assay

(QAC) Chlorure de Benzalkonium	<i>E. coli</i> ATCC 10536	1000		(Ntsama-Essomba <i>et al.</i> 1997)
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	250		(Ntsama-Essomba, Bouttier S, et Fourniat 1995)
	<i>P. aeruginosa</i> ERC1		2160	(Grobe, Zahller, et Stewart 2002)
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	50		(Luppens <i>et al.</i> 2002)
Cetrimide	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	> 400		(Dubois-Brissonnet <i>et al.</i> 1995)
Chlorine	<i>P. aeruginosa</i> ERC1		290	(Grobe, Zahller, et Stewart 2002)
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	20		(Dubois-Brissonnet <i>et al.</i> 1995)
Hypochlorite de sodium	<i>E. coli</i> ATCC 10536	5		(Ntsama-Essomba <i>et al.</i> 1997)
Glutaraldéhyde	<i>P. aeruginosa</i> ERC1		47	(Grobe, Zahller, et Stewart 2002)
Chlorhexidine digluconate	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	4		(Karpanen <i>et al.</i> 2008)
Phénols	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	1		(Dubois-Brissonnet <i>et al.</i> 1995)

5.2.3.2 Méthodes d'étude des mécanismes de résistance au sein des biofilms

Des méthodes d'évaluation de niveau de résistance aux biocides antibactériens, dans le cas particulier des biofilms, basées sur l'étude des mécanismes de résistance ont été développées. Bien que ces méthodes n'existent pas sous forme standardisée, elles s'avèrent robustes et permettent d'évaluer les effets bactéricides des biocides dans le contexte particulier des biofilms et sont adaptées aux expérimentations en routine.

5.2.3.2.1 Détermination de la diminution de transport d'un biocide au sein d'un biofilm par microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

Il est possible d'évaluer la limitation de transport d'un biocide au sein d'un biofilm, mécanisme important contribuant à l'émergence de la résistance des biofilms aux biocides antibactériens. Ceci peut être dû à une augmentation de la synthèse d'exopolysaccharides (EPS) résultant en une diminution significative de la pénétration des biocides dont l'efficacité est ainsi entravée. Il en résulte de faibles niveaux d'exposition des bactéries à l'agent antibactérien dans les régions plus profondes du biofilm et un risque accru d'adaptation des cellules au biocide conférant ainsi une meilleure survie à la population adaptée au biofilm.

L'émergence de techniques innovantes de microscopie optique telles que la MCBL et les améliorations apportées au marquage fluorescent permettent d'étudier directement la réactivité des biocides dans la structure native des biofilms (Bridier *et al.* 2011). La réactivité des agents biocides varie en fonction des interactions de la réaction, de l'adsorption et de la diffusion. La sensibilité des biofilms aux biocides peut être évaluée par MCBL en visualisant le schéma spatio-temporel des biofilms (Bridier *et al.* 2011) : les bactéries dans les biofilms sont colorées avec le colorant fluorescent, de sorte que les dommages à la membrane bactérienne (par les biocides) entraînent une fuite du colorant qui est surveillé en temps réel par MCBL. Les modèles de perte de fluorescence peuvent aider à la spécificité de l'action biocide et sa limitation, le cas échéant, dans la destruction des bactéries dans le biofilm.

5.2.3.2.2 Détermination de la modification de la membrane externe des bactéries dans un biofilm par RT-PCR, SDS-polyacrylamide

La modification des propriétés de la membrane (perméabilité aux biocides) peut être évaluée en analysant le profil des lipides.

Pour ce faire, les lipides sont extraits de la surface bactérienne et analysés par chromatographie en phase gazeuse (Guerin-Mechin *et al.* 2000) ou par chromatographie sur couche mince (Dubois-Brissonnet *et al.* 2011). Des techniques de spectrométrie de masse telles que la désorption / ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et l'ionisation par électrospray peuvent également être utilisées pour analyser le profil des lipides modifiés (Van Mourik *et al.* 2010). L'analyse des lipides révèle un pourcentage de chaque classe de lipides, à savoir saturés versus insaturés, phospholipides, lipides polaires et neutres, phospholipides

anioniques qui influenceront sur la perméabilité membranaire. Par exemple, une augmentation de la quantité d'acides gras insaturés dans la membrane augmente la fluidité rendant l'organisme résistant aux antibactériens (Kraus et Peschel 2008). La réduction de la quantité de phospholipides anioniques ou l'augmentation de la quantité de phospholipides cationiques peuvent entraîner une réduction de la charge négative nette et donc une résistance aux antibactériens cationiques.

Certaines bactéries modifient les fragments lipidiques / polymères d'acide téichoïque pour augmenter la résistance aux antibactériens cationiques (Peschel *et al.* 2001). L'ajout de groupes qui apportent une charge positive à la surface des lipides empêche l'interaction des antibactériens cationiques avec la surface bactérienne.

5.2.3.2.3 *Evaluation de l'efficacité de biocide et la résistance de certaines bactéries au sein d'un biofilm par la méthode d'hybridation in situ en fluorescence (FISH)*

La méthode FISH recouvre en grande partie le thème de l'efficacité des biocides sur les biofilms. Ainsi, il faut citer l'étude réalisée par Williams et Braun-Howland en 2003 (Williams et Braun-Howland 2003) qui ont évalué l'effet de l'acide hypochloreux et de la monochloramine sur des biofilms multi-espèces formés avec des bactéries isolées de systèmes de distribution d'eau. Les auteurs se sont en particulier focalisés sur la protection apportée par ces biofilms à *Escherichia coli* et *Legionella pneumophila*. Pour cela ils ont détecté la présence de ces deux bactéries au moyen de sondes oligonucléotidiques fluorescentes (spécifiques de *E. coli* et *L. pneumophila* ou universelle) par la méthode de FISH sur cellules entières après fixation des biofilms formés et observation microscopique. Cette méthode présente l'intérêt d'être extrêmement sensible puisqu'elle permet de détecter l'effet de doses très faibles d'un biocide (1 ppm en 10 minutes). D'autre part, elle permet également d'évaluer la résistance de certaines bactéries indésirables comme *L. pneumophila*.

6 Guide pour la construction d'une approche méthodologique d'évaluation de la capacité des bactéries à développer une résistance

La très grande diversité des usages et des revendications des produits biocides antibactériens, doit conduire au choix d'une démarche méthodologique la plus proche des conditions d'application et de leurs conséquences en termes d'exposition des micro-organismes aux produits biocides antibactériens. En effet, si bon nombre de micro-organismes ont cette capacité de s'adapter à des changements de leurs environnements, ceux-ci doivent être au plus proche de ceux rencontrés sur le terrain pour que les interprétations soient les plus pertinentes possibles dans le cadre de l'instruction d'un dossier d'approbation d'une substance active ou de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) d'un produit. Les données résultant d'analyses bibliographiques concernent le plus souvent les substances actives mais aussi, plus rarement cependant, des produits finis dont la composition complète n'est pas connue. Ces données ne pourront jamais être totalement exploitables pour des dossiers d'approbation d'une substance active ou produits soumis à des demandes d'AMM dont les usages et conditions d'application sont par nature très spécifiques.

En conséquence, pour les pétitionnaires et évaluateurs, l'évaluation du risque de voir se développer une résistance bactérienne à l'usage de tel ou tel produit biocide antibactérien doit être envisagée avec un protocole approprié tout en respectant une démarche méthodologique commune permettant ainsi des analyses et des comparaisons les plus objectives possibles.

Dans ce but, la construction d'une telle démarche méthodologique pourrait se dérouler en 3 étapes :

- 1- Elaboration du protocole expérimental adapté au produit biocide en recensant de manière la plus complète possible les paramètres nécessaires à la mise en place de l'approche méthodologique ;
- 2- Réalisation des essais ;
- 3- Analyse des résultats et conclusion sur l'apparition ou pas d'un phénomène de résistance au travers d'un arbre décisionnel.

6.1 Recenser de manière la plus complète possible les paramètres nécessaires à la mise en place de l'approche méthodologique (étape 1.a de l'avis)

6.1.1 Choix des paramètres liés aux produits

Ceux-ci doivent refléter le ou les usages, et la ou les conditions d'application telles que revendiquées par le pétitionnaire :

- La qualité de l'eau de dilution, *a minima* par sa (ses) dureté (s) et son (ses) pH ;
- La ou les concentrations ou dose d'emploi revendiquées ;
- La nature des traitements : unique, répétés, ou en continu ;
- Le ou les temps de contact préconisé(s) ;
- La nature du procédé d'application ;
- La présence ou non d'un rinçage final après traitement(s) pouvant amener à la prise en compte d'un continuum de concentrations, de la concentration d'emploi à une concentration résiduelle à définir, notamment en prenant en compte les seuils de détection des méthodes de dépistage à partir de milieu liquide ou à partir de surface. Ce choix permet d'envisager les situations pire-cas ;
- La ou les températures revendiquées lors des applications.

6.1.2 Choix des paramètres liés aux micro-organismes

- Les micro-organismes doivent provenir du terrain, leur origine devant être clairement précisée.

- Le choix des micro-organismes, provenant du terrain, et leur diversité en termes d'espèces bactériennes est en lien direct avec les revendications du pétitionnaire. A défaut d'une liste précise figurant dans ces revendications, les espèces bactériennes reconnues par les professionnels comme les plus dommageables devront être prises en compte. Les espèces bactériennes des normes du CEN TC 216 peuvent aussi être retenus dans la mesure où le champ d'application d'une de ces normes est adapté.
- Les souches de collection des espèces bactériennes provenant des normes du CEN TC 216 doivent être aussi testées comme contrôle.
- *A minima*, 5 souches par espèce bactérienne doivent être retenues.
- La taille des *inocula* servant aux essais doit être en cohérence avec les réalités du terrain (par unité de volume ou de surface, ex : *inoculum* riche de 10^6 à 10^8 dans le cas d'élevages – 10^1 à 10^3 dans des milieux pauvres comme l'industrie pharmaceutique ou un bloc opératoire). Ce choix doit être argumenté par des données scientifiques reconnues.
- L'état physiologique des micro-organismes d'essais (cellules en croissance ou en phase stationnaire) doit être précisé.
- Un cas particulier peut être abordé selon la nature des revendications, c'est celui de la prise en compte des biofilms dont les conditions de production devront être détaillées.

6.1.3 Choix des paramètres en lien avec les environnements traités

- Il faudra tenir compte de la grande diversité des milieux inoculés, les uns étant riches en matières organiques et minérales, les autres étant peu ou très peu chargés en ces matières. A des fins de standardisation, les normes du CEN/TC 216 contiennent, pour les grands domaines d'application (santé humaine, santé animale, milieux industriels, ...), des milieux standards utilisables, même si des milieux naturels seraient plus souhaitables.
- Deux types de milieux sont rencontrés : les milieux liquides, essentiellement l'eau, et les milieux solides. Dans le second cas de figure, la nature des surfaces doit être représentative des réalités du terrain : par exemple, ne pas utiliser du verre si l'acier inox, l'aluminium, le polyéthylène ou le caoutchouc synthétique sont les plus représentatifs.

6.2 Déterminer la méthode d'évaluation de la résistance des espèces bactériennes cibles vis-à-vis du produit biocide (étape 1.b de l'avis)

Lors de l'analyse de la littérature scientifique, une grande diversité de méthodes utilisées a été constatée et le choix de celles-ci n'est pas obligatoirement en phase, ni avec les usages ni avec les conditions d'application.

L'élaboration du protocole expérimental devra contenir deux étapes :

- Etape 1 : rechercher la ou les méthodes d'évaluation de la capacité d'adaptation des espèces bactériennes cibles vis-à-vis du produit biocide étudié compte tenu de ses usages et de ses conditions d'application.
- Etape 2 : si une résistance est observée à l'étape 1, rechercher une méthode qui permet de confirmer ou pas la stabilité de cette résistance.

Afin d'illustrer de manière pratique l'élaboration de ces protocoles expérimentaux, un exemple de protocole qui pourrait être commun à tous les domaines d'utilisation est proposé. Ensuite des exemples représentatifs de produits retrouvés dans l'un des grands domaines d'utilisation déjà abordés précédemment sont présentés ci-dessous.

6.2.1 Paramètres communs à tous les domaines d'utilisation

6.2.1.1 Choix des paramètres liés au produit

6.2.1.1.1 Choix des concentrations d'essais et de la qualité des solutions d'essais

Des résidus de produit biocide sont susceptibles de rester sur les surfaces traitées, traduisant une série de défauts qui peuvent se produire lors des sous-dosages en produits ou lors d'une élimination incomplète de résidus de biocides. En conséquence, une ou deux gammes de 3 concentrations d'essais seront retenues : la concentration d'emploi plus deux concentrations inférieures, au 1/2 et au 1/4. Dans le cas d'un rinçage : 3 concentrations au 1/10, 1/100, 1/1000 seront testées. Cette seconde gamme de concentrations sera choisie en alternative ou par défaut, en l'absence de données sur les seuils de détection des méthodes d'analyse. Ces solutions seront préparées dans une eau de dureté adéquate à l'usage du produit.

6.2.1.1.2 Choix des fréquences d'application du produit et de ses séries de concentrations, puis de la durée des contacts « produits – micro-organismes »

Ce point est très important puisque, comme la littérature scientifique le démontre, les phénomènes d'adaptation peuvent intervenir soit après un seul contact, soit après des contacts répétés : les traitements sont-ils appliqués une ou plusieurs fois dans la journée sur un même site, une fois par jour, une fois par semaine, ...? De même, lors de chaque application, quelle est la durée du contact en milieu liquide ou, pour les surfaces, avant rinçage par exemple ? ou bien le produit est-il appliqué sans rinçage ? Dans ce dernier cas de figure, le produit est-il stable sur la surface ou dans le liquide traité ? Tous ces éléments pré-établis conduiront aux choix essentiels des conditions de contact entre chaque produit et les micro-organismes d'essais.

6.2.1.1.3 Choix des paramètres liés aux micro-organismes : choix des micro-organismes d'essais et des suspensions d'essais

Il semble pertinent de suivre les prescriptions des normes européennes du CEN/TC216 dans le choix des souches à tester pour certain usages (TP1, 2, 3, 4). Ainsi, une série de 5 souches collectées du terrain et représentatives des espèces bactériennes des normes spécifiques du ou des domaines ciblés devront être choisies. Pour les usages pour lesquels des normes européennes du CEN/TC216 existent, les souches de ces normes représentatives du domaines d'utilisation, seront également testées à titre de contrôle.

Ces suspensions bactériennes sont préparées dans un milieu organique représentatif du ou des domaines ciblés. A défaut d'un milieu totalement représentatif de ceux-ci, les normes européennes du CEN/TC 216 offrent une série de solutions standards (ex : lait, albumine, sang, ...) représentant de faibles ou forts niveaux de salissures. Le choix de ces milieux organiques doit être argumenté par le pétitionnaire. Il en est de même pour le choix du niveau d'*inoculum* choisi

6.2.1.1.4 Choix des paramètres en lien avec les environnements traités : choix des milieux et conditions physiques d'application

Suivant les revendications, ces séries de concentrations seront appliquées soit dans un milieu liquide (exemple d'une application par trempage) ou, et par dépôt ou pulvérisation sur surfaces. Le choix de la surface ou des surfaces d'essai doit être argumenté et la plus représentative possible du ou des domaines ciblés.

Le choix des températures, lors de l'application, doit également être en cohérence avec les conditions d'emploi autorisées.

Tous ces paramètres étant clairement définis, les protocoles expérimentaux nécessaires pour étudier l'exposition des micro-organismes aux biocides antibactériens, ceci au plus proche des réalités du terrain, pourront alors être élaborés. Ensuite, afin de finaliser le protocole expérimental, une autre étape doit être envisagée. C'est le choix de méthodes nécessaires pour déterminer si oui ou non un phénomène d'adaptation est apparu, pour vérifier que ce phénomène est stable ou pas et pour vérifier le cas échéant si les micro-organismes cibles sont aussi adaptés à d'autres biocides antibactériens auxquels ils n'ont pas été exposés, voire des antibiotiques.

6.2.1.1.5 Détermination des niveaux de résistance

La littérature scientifique offre une diversité de méthodes d'évaluation du niveau de résistance sans toujours être en phase avec les objectifs des traitements en termes de performance. Avant d'aborder ce choix de

méthodes, il est important de prendre en compte le fait que celles-ci doivent permettre de répondre à plusieurs questions :

- Les souches bactériennes se sont-elles adaptées ?
- Cette adaptation se produit-elle dans une zone de concentrations proche des concentrations d'emploi ou, et proche des concentrations résiduelles ?
- Les souches bactériennes résistantes au biocide étudié se sont-elles devenues résistantes à d'autres substances actives biocides antibactériennes ?
- La sensibilité des souches bactériennes résistantes au biocide étudié a-t-elle changé vis-à-vis d'une gamme large d'antibiotiques les faisant passer d'un phénotype sensible à résistant ?

Répondre à ces questions signifie s'orienter vers le choix de méthodes les plus appropriées.

- *Les souches bactériennes se sont-elles adaptées ?* La réponse à cette question, ne prenant pas en compte à ce stade les diverses concentrations en produit pouvant être retrouvées sur le terrain, peut être faite en comparant les CMI avant et après les contacts avec l'une ou les deux gammes de concentrations citées plus avant. Le calcul des ratios permet d'apprécier l'amplitude de cette évolution pour toutes ou partie de ces concentrations d'essais.
- *La bactérie est dite « résistante » au biocide selon les publications lorsque la CMI du biocide est augmentée d'un facteur au moins 4 par rapport à la CMI initiale (Cowley et al. 2015).*
- *Si une adaptation est observée, cela modifie-t-il le comportement des souches bactériennes au niveau des concentrations d'essais ?* La réponse à cette question peut être obtenue en déterminant les valeurs de « D » via la méthode de cinétique de destruction décrite en 5.2.2.6 des souches adaptées et des souches avant contacts. Cette valeur de « D », temps nécessaire pour obtenir une réduction décimale d'une population initiale, peut être déterminée au moyen de la méthodologie de la norme NF EN 1040, en l'adaptant. Cette méthode sera complétée par l'application *stricto sensu* de cette même norme EN 1040 déterminant, sur la base d'un temps de 5 min et d'une chute de titre de $5 \log_{10}$, une concentration minimale bactéricide.
- *Le cas échéant, les souches bactériennes ayant subi des contacts avec l'une ou les deux gammes de concentrations sont-elles résistantes à d'autres substances actives biocides auxquelles elles n'ont pas été exposées ?* La méthode des CMI peut être un révélateur d'un phénomène d'adaptation croisée avec une ou plusieurs autres substances actives biocides. Cette recherche concernera les souches adaptées. Sur la base des valeurs obtenues, des ratios sont calculés révélant l'amplitude de l'éventuel phénomène d'adaptation.
- *Les souches bactériennes ayant subi des contacts avec l'une ou les deux gammes de concentrations sont-elles résistantes à des antibiotiques ?* La méthode des CMI classiquement recommandée pour la détermination du phénotype de résistance vis-à-vis des antibiotiques sera appliquée dans le respect des recommandations internationales pour comparer les souches exposées au biocide (adaptées) aux CMI initiales. Les antibiotiques représentatifs de différentes classes seront choisis en fonction des espèces bactériennes étudiées et des risques pour la santé humaine et la santé animale.

A noter que dans ce protocole commun et dans les exemples de choix de paramètres qui suivent, la méthode CMI est proposée pour déterminer le niveau de résistance. Néanmoins, dans le chapitre 5.3.2, un panel de méthodes permettant de déterminer le niveau de résistance est proposé. Le pétitionnaire a le libre choix d'utiliser la méthode la plus adaptée pour déterminer le niveau de résistance pour son produit ou sa substance active.

6.3 Réalisation des essais : Exemples de choix de paramètres pour chaque grand domaine d'utilisation (étape 2 de l'avis)

Pour les produits de traitement de surface, les paramètres proposés dans le protocole commun sont adaptés à ce domaine d'utilisation. Concernant les autres domaines, des exemples de choix de paramètres spécifiques sont détaillés ci-dessous par domaine d'utilisation. Il a été noté que les paramètres décrits ci-dessous sont valables pour les deux étapes de détermination de la résistance des espèces bactériennes vis-à-vis du produit biocide (étape de détermination de la capacité d'adaptation et le cas échéant, l'étape de confirmation de la stabilité du phénomène de résistance).

6.3.1 Produits de protection antibactériens

Pour illustrer ce domaine d'utilisation, un produit de protection dit « agent conservateur » contenu dans un détergent utilisé en TP6 (protection des produits manufacturés pendant leur stockage) est pris comme exemple. Ce conservateur a un effet préventif qui va empêcher toute prolifération de bactéries d'altération dans le produit détergent appelé matrice. La contamination bactérienne pourra avoir lieu au moment de la fabrication du produit détergent.

Il est à noter que le traitement curatif d'un produit de protection n'est pas traité dans cette section.

6.3.1.1 Choix des paramètres liés au produit

6.3.1.1.1 Choix des concentrations d'essais et de la qualité des solutions d'essais

Ce produit conservateur se trouvant dans la matrice à des concentrations très faibles, son activité est de nature bactériostatique plutôt que bactéricide. Par conséquent, les concentrations retenues pour les essais seront la concentration d'emploi (CE) et deux concentrations inférieures CE/2 et au CE/4.

6.3.1.1.2 Choix des fréquences d'application du produit et de ses séries de concentrations, puis de la durée des contacts « produits – micro-organismes »

Le temps de contact sera unique. La durée de contact pourra être de plusieurs jours à plusieurs mois pour couvrir une durée jusqu'à l'ouverture du produit.

6.3.1.1.3 Choix des paramètres liés aux micro-organismes : choix des micro-organismes d'essais et des suspensions d'essais

Les espèces bactériennes (2 à 3 espèces avec au moins 1 Gram positif et 1 Gram négatif) susceptibles de détériorer les matrices dans lesquels le conservateur est ajouté devront être choisies en fonction du type de la matrice (à titre d'exemple peuvent être cités *Pseudomonas*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Staphylococcus*, *Alcaligenes*, ...). Une série de cinq souches par espèce bactérienne cible sera retenue et chacune des souches sera mis en contact en présence du conservateur dans la matrice. L'efficacité antibactérienne des agents conservateurs étant en fonction de la concentration bactérienne, différentes tailles d'inoculum bactérien choisies à partir des données de niveaux de contamination observés en pratique pourront être testées.

6.3.1.2 Choix des paramètres en lien avec les environnements traités : choix des milieux et conditions physiques d'application

Pour se rapprocher des conditions pratiques, ce conservateur sera testé dans sa matrice (détergent).

6.3.1.3 Détermination des niveaux de résistance

Par définition un agent conservateur ayant un effet préventif et donc présent en faibles concentrations, agira principalement au niveau d'un seul site cible du micro-organisme (membrane, ADN, ribosomes, protéines ...) et pourra par conséquent conduire à une plus grande probabilité d'apparition de phénomènes d'adaptation et de développement de résistance par rapport à un composé utilisé à fortes concentrations.

Pour révéler un phénomène d'adaptation, il est attendu que la CMI vis-à-vis de l'agent conservateur soit augmentée d'un facteur 4 par rapport à la CMI initiale avant l'étape d'adaptation.

Si les bactéries ont développés un phénomène de résistance au produit conservateur, cette résistance peut avoir un impact sur la sensibilité à d'autres substances biocides et aux antibiotiques. Par conséquent, une mesure de la CMI à ces biocides et antibiotiques sera réalisée pour révéler potentiellement des modifications de sensibilité suite à l'exposition à ces agents antimicrobiens. Ces CMI sont comparées avec les CMI initiales et les bactéries seront considérées comme résistantes si la différence est supérieure à un facteur 4.

6.3.2 Produits destinés à l'hygiène humaine

6.3.2.1 Choix des paramètres liés au produit

Les conditions d'essais doivent se rapprocher des conditions prévues dans les normes d'essais du CEN/TC 216 des produits destinés à l'hygiène des mains. Par conséquent, les concentrations retenues pour les essais seront la concentration revendiquée et deux sous-concentrations.

6.3.2.1.1 Choix des concentrations d'essais et de la qualité des solutions d'essais

Les concentrations retenues pour les essais, sur la base de la concentration d'emploi seront la concentration d'emploi plus deux concentrations inférieures, au 1/2 et au 1/4.

6.3.2.1.2 Choix des fréquences d'application du produit et de ses séries de concentrations, puis de la durée des contacts « produits-micro-organismes »

Le temps de contact préconisé est entre 30 et 120 secondes (jusqu'à 5 minutes pour les lavages de mains à des fins chirurgicales).

Les fréquences d'application sont différentes en fonction de l'usage et de l'utilisateur :

- Produits destinés aux professionnels :
 - Lavage hygiénique des mains (savons antibactériens) : 10 applications / personne / jour
 - Désinfection hygiénique (solutions hydroalcooliques) : 25 applications / personne / jour
 - Lavage des mains et désinfectant pour les mains à des fins chirurgicales : lavage chirurgical des mains (savons antibactériens) : 10 applications / personne / jour, et désinfection chirurgicale (solutions hydroalcooliques) : 4 applications / personne / jour
- Produits destinés aux non professionnels (savons et solutions hydroalcooliques) : 5 applications / personne / jour

6.3.2.2 Choix des paramètres liés aux micro-organismes : choix des micro-organismes d'essais et des suspensions d'essais

Comme pour les produits de traitement des surfaces où il est préconisé de suivre les prescriptions des normes européennes du CEN/TC216, il est pertinent de conserver les souches employées lors de ces essais. Ainsi les espèces bactériennes décrites dans la norme NF EN 13727¹⁵ devraient être choisies comme modèles bactériens pour les micro-organismes prélevés sur le terrain. L'essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide en médecine (phase 2, étape 1) préconise deux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*) et 2 Bacilles à Gram négatif tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* K12 ainsi qu'en souche additionnelle tout micro-organisme pertinent (par exemple les entérobactéries sont connues pour leur aptitude à acquérir une résistance ou une tolérance).

6.3.2.3 Choix des paramètres en lien avec les environnements traités : choix des milieux et conditions physiques d'application

Il semble approprié, pour se rapprocher à la fois des conditions pratiques et des conditions des tests effectués pour qualifier ces produits, d'utiliser les méthodes normalisées internationales de bactéricidie en présence de substances interférentes des conditions de propreté ou et de saleté.

6.3.2.4 Détermination des niveaux de résistance

Le niveau de résistance sera évalué par comparaison de la CMI du biocide vis-à-vis des souches étudiées avec la CMI initiale avant l'étape d'adaptation. La différence mesurée entre la concentration efficace classique et celle considérée comme montrant une résistance devrait être d'un facteur 4 au moins pour être considérée comme significative.

Les niveaux de résistance aux autres biocides et antibiotiques des souches résistantes seront également évalués par comparaison des CMI avec les CMI initiales. Ces souches seront considérées comme résistantes si la différence est supérieure à un facteur 4.

¹⁵ Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide en médecine – Méthode d'essai et prescription

6.3.3 Produits de traitement de l'eau

6.3.3.1 Choix des paramètres liés au produit

6.3.3.1.1 Choix des concentrations d'essais et de la qualité des solutions d'essais

Les concentrations doivent être adaptées au type de réseau d'eau à traiter, circuit fermé ou ouvert, ainsi qu'aux doses rejetées en sortie en cas de circuit ouvert. Les concentrations revendiquées doivent être testées en fonction des conditions d'utilisation. Les essais devront ainsi tenir compte du taux de renouvellement d'eau. Une gamme de 3 concentrations d'essais seront retenues : la concentration d'emploi plus deux concentrations inférieures au 1/2 et au 1/4.

6.3.3.1.2 Choix des fréquences d'application du produit et de ses séries de concentrations, puis de la durée des contacts « produits – micro-organismes »

Deux types de traitements sont généralement appliqués en traitement de l'eau : traitement choc ou continu. Dans le premier cas, il s'agit d'appliquer une forte concentration de produit biocide en réponse à une contamination avérée, le second permet d'éviter une contamination (ou re-contamination) du réseau. Les deux types de traitement doivent donc être testés. Concernant la durée de traitement, elle doit être évaluée en fonction de la cinétique de chute de concentration du produit biocide dans le système revendiqué, qui dépend fortement de son volume total et de la dynamique de renouvellement de l'eau dans celui-ci.

6.3.3.2 Choix des paramètres liés aux micro-organismes : choix des micro-organismes d'essais et des suspensions d'essais

Après avoir retenu, pour chaque genre bactérien usuellement rencontré dans les réseaux d'eau, une série de 5 souches représentatives, en particulier pathogènes (*Legionella* sp. et *Pseudomonas aeruginosa* notamment), des suspensions bactériennes sont préparées dans une eau représentative du réseau ciblé. Le choix de ces eaux doit être argumenté par le pétitionnaire. Il en est de même pour le choix du niveau d'*inoculum* choisi.

6.3.3.3 Choix des méthodes de numération bactérienne

Certaines bactéries contaminantes de l'eau, comme *Legionella pneumophila*, ont la capacité en réponse aux stress d'adopter un état VNC (Viable non cultivables). Cela conduit alors à sous-estimer les populations bactériennes résiduelles viables après traitement si la seule détermination d'UFC est utilisée pour évaluer celles-ci. Il conviendra donc de corréliser les efficacités déterminées par dénombrements avec des méthodes moléculaires, qPCR ou vPCR.

6.3.3.4 Choix des paramètres en lien avec les environnements traités : Choix des milieux et conditions physiques d'application

Suivant les revendications, et en particulier les réseaux et installations à traiter, les paramètres physicochimiques de l'eau peuvent être très variés en termes de température, pH, dureté, salinité, concentrations en matières organiques, voire même particules en suspension. En effet, certaines tours aérorefrigérantes utilisent des apports d'eaux de surface par exemple. Les tests doivent donc être menés, pour chacun des systèmes revendiqués, dans une eau "représentative" dudit système, afin de tenir compte des interférences entre les biocides testés et les composants de l'eau à traiter.

6.3.3.5 Détermination des niveaux de résistance

Le niveau de résistance sera évalué par comparaison de la CMI du biocide vis-à-vis de la CMI initiale avant l'étape d'adaptation et les souches bactériennes seront considérées comme résistantes si la différence est supérieure à un facteur 4. Les niveaux de résistance aux autres biocides et antibiotiques des souches résistantes seront également évalués par comparaison des CMI avec les CMI initiales. Ces souches seront considérées comme résistantes si la différence est supérieure à un facteur 4.

6.3.4 Produits de traitement des biofilms

6.3.4.1 Choix des paramètres liés au produit

6.3.4.1.1 Choix des concentrations d'essais et de la qualité des solutions d'essais

Les concentrations testées doivent être adaptées aux types de surfaces traitées et un rinçage peut être préconisé selon les cas. Les concentrations doivent être testées en fonction des conditions d'utilisation. Ainsi, une ou deux gammes de 3 concentrations d'essais seront retenues : la concentration d'emploi plus deux concentrations inférieures au 1/2 et au 1/4 (dans le cas d'un rinçage, 3 concentrations au 1/10, 1/100, 1/1000 seront testées).

6.3.4.1.2 Choix des fréquences d'application du produit et de ses séries de concentrations, puis de la durée des contacts « produits – biofilms »

Deux types de traitements seront étudiés : traitement unique et traitement continu. Les phénomènes d'adaptation peuvent intervenir soit après un seul contact, soit après des contacts répétés. Les fréquences d'application et durée de contact du produit seront choisies en adéquation avec les applications ciblées.

6.3.4.2 Choix des paramètres liés aux micro-organismes : choix des micro-organismes d'essais et des suspensions d'essais

Une série de 5 souches représentatives des biofilms du ou des domaines ciblés sera étudiée. Des suspensions bactériennes seront préparées dans un milieu de culture en suivant les normes européennes du CEN/TC 216. Les choix de ces milieux et du niveau d'inoculum choisi devront être représentatifs de la concentration dans un biofilm et être justifiés par le pétitionnaire.

Dans le cas spécifique des biofilms, l'efficacité des biocides sera testée d'une part en conditions de culture « normale » (c'est-à-dire sans biofilm) et également en situation de biofilm mono et pluri-spécifiques, afin de comprendre les modes d'action des biocides testés sur les différentes souches et dans des cas de figure au plus proches des réalités du terrain.

6.3.4.3 Choix des paramètres en lien avec les environnements traités : choix des milieux et conditions physiques d'application

Suivant les revendications, et les types de surfaces à traiter, des séries de concentrations seront appliquées soit dans un milieu liquide (exemple traitement de biofilm en piscine) ou, et par dépôt ou pulvérisations sur surfaces (traitement de murs de maison par exemple). Le choix des surfaces testées et des conditions environnementales lors des essais doivent être argumentées et être les plus représentatives possibles des applications ciblées.

6.3.4.4 Détermination des niveaux de résistance

Le niveau de résistance des bactéries sera tout d'abord testé en microplaques, et évalué selon trois approches selon les types d'applications :

- 1) En cas d'utilisation de biocide(s) en concentration sublétales, les valeurs de « D » seront déterminées par la réalisation de cinétique de destruction des souches adaptées et des souches avant contacts. Les valeurs de « D » correspondent au temps requis pour l'obtention d'une réduction décimale d'une population initiale qui est déterminée en suivant le protocole de la norme NF EN 1040, en l'adaptant si nécessaire.
- 2) En cas de présence résiduelle de biocide(s) dans le milieu, le niveau de résistance sera évalué par comparaison de la CMI du biocide vis-à-vis des souches étudiées avec la CMI initiale (avant l'étape d'adaptation) et les souches bactériennes seront considérées comme résistantes si la différence est supérieure à un facteur 4.
- 3) Si un phénomène de résistance au biocide étudié est observé, les CMI aux autres biocides / antibiotiques seront mesurées et comparées aux CMI initiales. Les bactéries constituant le biofilm seront considérées comme résistantes si la différence est supérieure à un facteur 4.

Les niveaux de résistance seront ensuite étudiés en situation de biofilms (mono ou pluri-spécifiques selon les cas) en présence soit de concentrations résiduelles de biocides ou soit d'antibiotiques. Pour les deux situations (test en microplaques et biofilm) les paramètres suivants peuvent être évalués :

- 1) Les taux de synthèse d'EPS ;
- 2) Les modifications des propriétés de la membrane bactérienne ;
- 3) Les systèmes d'efflux permettant d'expulser des antibiotiques contribuent au phénotype MDR (multi drug resistant) des bactéries. L'évaluation des systèmes de flux par des méthodes conventionnelles telles que la rétention du bromure d'éthidium (EtBr, de colorant fluorescent) ou par utilisation d'antibiotiques radiomarqués ;
- 4) Le développement de population spécifique résistante peut être détecté par la méthode FISH.

Pour les paramètres 1, 2 et 4, la description des méthodes est détaillée en 5.2.3.2.

6.4 Analyse des résultats et conclusion sur l'apparition ou pas d'un phénomène de résistance au travers d'un arbre décisionnel : Exemple d'arbre décisionnel (étape 3 de l'avis)

A partir des données produites lors de la réalisation du protocole décrit ci-dessus, le risque potentiel de voir se développer un phénomène de résistance peut être évalué. A cet effet, un exemple d'arbre décisionnel est proposé (figure 3).

Cet arbre décisionnel proposé ci-après décrit le cas d'un produit X désinfectant, destiné à un traitement de surfaces dures, sans rinçage, appliqué à sa concentration d'emploi (CE). Cet exemple considère qu'une application unique est réalisée.

L'exposition est réalisée à la concentration d'emploi (CE) – et 2 concentrations CE/2 et CE/4.

Le protocole expérimental est composé de deux étapes :

Etape 1 : Détermination de la capacité d'adaptation des bactéries au biocide antibactérien testé.

Etape 2 : Détermination de la stabilité du phénomène de résistance et le cas échéant, via une recherche bibliographique, vérifier l'existence d'une possible résistance croisée à d'autres biocides et antibiotiques. Cette étape n'est réalisée que si une adaptation est observée à l'étape 1.

Il est indispensable de déterminer le niveau de résistance, avant et après l'étape de la capacité d'adaptation (étape 1). De même le niveau de résistance devrait être mesuré si l'étape 2 est réalisée.

La CMI est choisie comme méthode de détermination du niveau de résistance. Ainsi, la CMI « initiale » du biocide testé avant l'étape 1 est à réaliser selon la méthode décrite en 5.2.2.1, sur les souches prélevées à partir du terrain et sur des souches de collection des normes applicables du CEN TC 216.

Puis le protocole expérimental est déroulé comme présenté précédemment :

- Etape1 : Evaluation de la capacité d'adaptation des bactéries au biocide X : suite à l'application du produit X, l'évaluation de la capacité d'adaptation des bactéries est réalisée comme décrit en 5.1.2. Cette étape est suivie par la détermination du niveau de résistance selon la méthode de CMI. Les cas suivants peuvent se présenter :
 - La CMI après l'étape d'adaptation est identique à la CMI initiale des souches de terrain (cas « Non » dans l'arbre décisionnel) : Aucune modification de CMI n'est observée.
 - ⇒ Dans ce cas, il est considéré que le risque de développement de résistance est absent dans les conditions d'application du produit X. Aucun test n'est nécessaire pour vérifier une résistance croisée aux autres biocides et ou antibiotiques.
 - La CMI après l'étape d'adaptation est supérieure à la CMI initiale des souches de terrain (cas « Oui » dans l'arbre décisionnel) : Un phénomène d'adaptation vis-à-vis du produit biocide X objet de l'étude est observé. Il faudra continuer le protocole expérimental par l'étape 2. Vérifier :
 - Si ce phénomène d'adaptation est stable ou non en l'absence du produit biocide X
 - Le cas échéant en fonction des données de la littérature, s'il y a un risque de développement de résistance croisée à d'autres biocides (gamme de biocides de familles chimiques différentes et représentatifs du domaine d'utilisation) et ou antibiotiques (classiquement utilisés chez l'homme et, ou l'animal) ?

- Etape 2 : Vérification de la stabilité du phénomène d'adaptation au biocide X : la vérification de la stabilité de la résistance est réalisée selon les méthodes développées en 5.1.3 et suivie de la détermination du niveau de résistance selon la méthode de CMI.
 - ⇒ Si le phénomène d'adaptation n'est pas stable et disparaît, le risque de développement de résistance pour le produit X étudié est absent.
 - ⇒ Si le phénomène d'adaptation est maintenu vis-à-vis du produit biocide X, il est considéré que le développement d'une résistance bactérienne à ce produit est confirmé dans les conditions d'application revendiquées pour le produit X. Des stratégies de gestion de la résistance devront être envisagées suite à l'autorisation du produit X.

- Le cas échéant, vérification de la résistance croisée à d'autres biocides et ou antibiotiques : Il faudra d'abord identifier des substances actives et ou antibiotiques susceptibles de déclencher un phénomène de résistance croisée avec le produit X objet de l'étude. Le choix de ces substances actives et ou antibiotiques pourrait se faire via une recherche bibliographique.
 - ⇒ En cas d'absence de données dans la littérature supportant l'existence de résistance croisée, le risque de développement de résistance croisée à d'autres substances biocides et ou antibiotiques est considéré comme absent.

 - ⇒ S'il existe des données dans la littérature sur la résistance croisée à d'autres substances biocides et ou antibiotiques, la même procédure que pour le produit X est à suivre afin de vérifier si un phénomène de résistance croisée existe :
- Détermination du niveau de cette résistance croisée selon la méthode CMI. Deux cas peuvent se présenter :
 - CMI identique à CMI initiale après l'étape d'adaptation : Dans ce cas, il est considéré que le risque de développement de résistance croisée est absent dans les conditions d'application du produit X.
 - CMI > CMI initiale après l'étape d'adaptation : Un phénomène de résistance croisée est observé. Il faudra continuer l'étape 2 du protocole expérimental. Vérifier :
 - Si ce phénomène de résistance croisée est stable ou non en l'absence du produit biocide : la vérification de la stabilité de la résistance croisée est réalisée selon les méthodes développées en 5.1.3 et suivie de détermination du niveau de résistance croisée selon la méthode CMI.
 - ⇒ Si le phénomène d'adaptation n'est pas stable et disparaît, le risque de développement de résistance croisée est absent.
 - Si le phénomène de résistance croisée est maintenu, il est considéré que le développement d'une résistance croisée est confirmé dans les conditions d'application revendiquées pour le produit X. Des stratégies de gestion de la résistance croisée devront être envisagées suite à l'autorisation du produit X.

NB :

- Toute la démarche méthodologique faite ci-dessus vaut pour une évaluation d'un phénomène de résistance dans le cadre d'un Dossier « Produit Biocide ». Dans le cas d'un Dossier « Substance Active », cette démarche peut aussi s'appliquer dans la mesure où cette évaluation devra se faire sur le produit représentatif décrit dans le dossier.
- La même démarche est à suivre dans le cas d'un produit biocide ayant plusieurs substances actives.
- L'arbre décisionnel présenté ci-après est considéré comme un arbre de décision « simplifié », qui n'a pas pour vocation à décrire de façon exhaustive tous les cas envisageables.

CE = concentration d'emploi
 CE/2, CE/4 représentent les concentrations rencontrées en sous dosage ou mauvaise élimination du produit
 (*) Désinfectant
 (**) CMI initiale des souches prélevées du terrain
 (***) via une recherche bibliographique

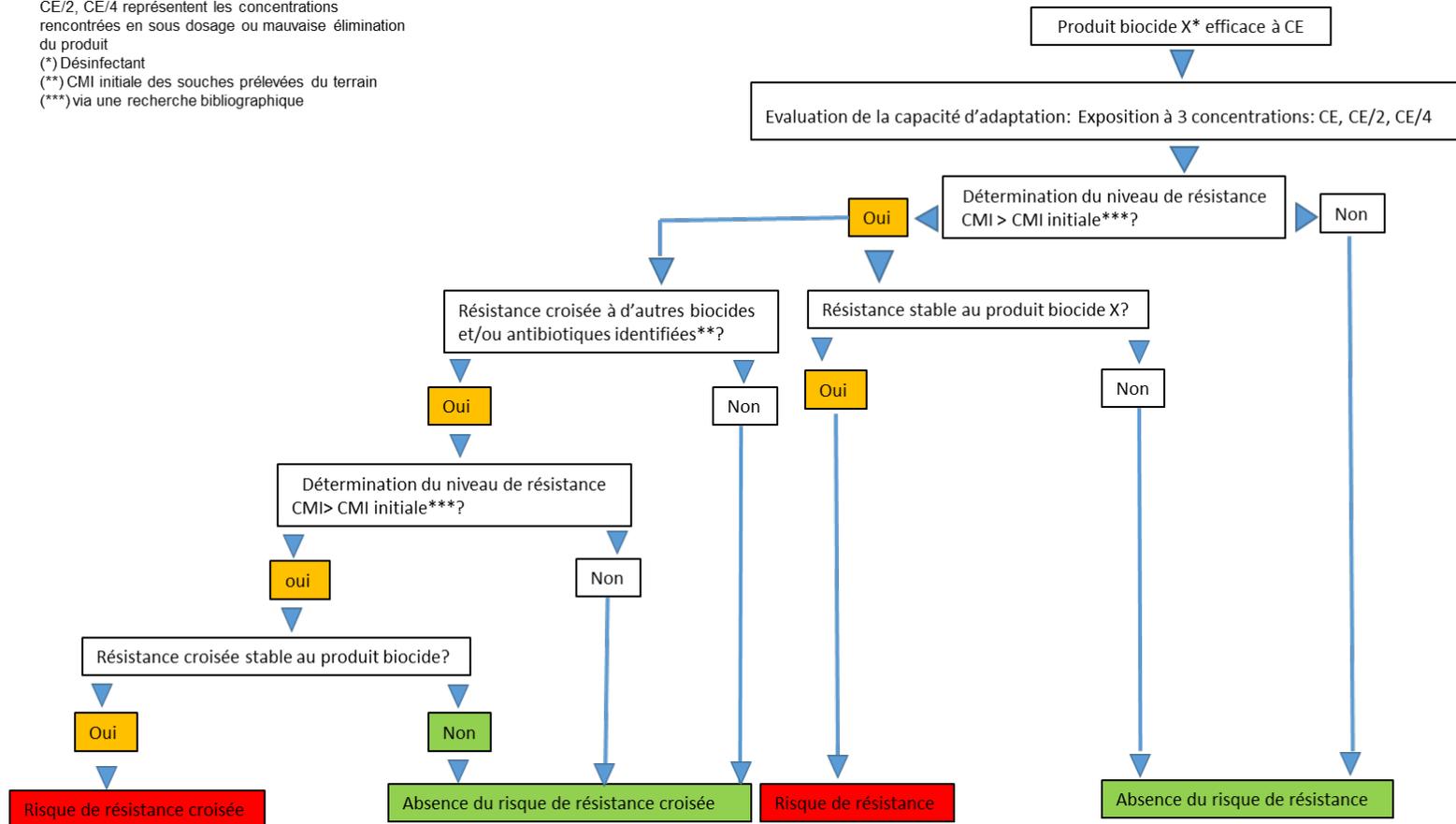


Figure 3 : Exemple d'un arbre décisionnel illustrant le protocole d'évaluation de résistance d'un produit désinfectant pour les surfaces

7 Stratégies de gestion de l'apparition de la résistance

La résistance bactérienne renvoie le plus souvent au thème de l'antibiorésistance. Celle-ci fait l'objet, tant au niveau français qu'au niveau européen d'une surveillance bien encadrée par une série de textes (Directive, Décisions, ...) déclinés ensuite au sein de chaque Etat-Membre de l'Union Européenne. A cela peuvent s'ajouter des réseaux nationaux de surveillance, et tout cet ensemble permet de suivre les niveaux de résistance de souches bactériennes d'intérêt d'origines diverses (d'élevages, environnementales, cliniques). Ces suivis, concernant un large éventail d'antibiotiques, de classes d'antibiotiques mais aussi d'antibiotiques dits « critiques », sont réalisés au moyen de mesures de CMI, standardisées au niveau international, et le seront davantage dans l'avenir par des études moléculaires. La conséquence de ces résultats est la mise en œuvre de mesures de gestion de l'antibiorésistance.

Dans le cadre du Règlement Biocides, des principes, en termes d'évaluation, sont établis et décrits au point 75 de l'annexe VI :

« Si une résistance ou une résistance croisée à la substance active contenue dans le produit biocide est susceptible de se développer, l'organisme évaluateur prend des mesures afin de réduire au minimum les conséquences de cette résistance. Les mesures possibles comprennent la modification des conditions d'octroi d'une autorisation. Cependant, si le développement d'une résistance ou d'une résistance croisée ne peut être suffisamment réduit, l'organisme évaluateur conclut que le produit biocide ne satisfait pas au critère énoncé à l'article 19, paragraphe 1, point b) ii) ». Cet article stipule que « le produit biocide ne doit avoir aucun effet inacceptable sur les organismes cibles, en particulier une résistance ou une résistance croisée inacceptable, ou des souffrances et des douleurs inutiles chez les vertébrés. ».

7.1 Mesures de gestion

De manière générale, afin de prévenir l'apparition de résistance, il convient de limiter les mésusages pouvant notamment conduire à l'exposition des bactéries cibles à des concentrations sub-létales favorisant leur adaptation. Ainsi les instructions d'utilisation mentionnées dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) annexé à l'autorisation doivent mentionner le respect absolu des conditions d'autorisation :

« Toujours lire l'étiquette ou la notice avant emploi et suivre toutes les consignes indiquées. »

« Respecter les conditions d'emploi du produit (concentration, temps de contact, température, pH, etc) »

L'obligation pour l'utilisateur professionnel d'analyser les causes d'inefficacité du traitement et d'informer le pétitionnaire en cas d'inefficacité du traitement participe également au suivi du risque de résistance. Il convient également de le faire figurer dans le RCP du produit :

« Les causes d'inefficacité du traitement doivent être recherchées »

« Informer le pétitionnaire en cas d'inefficacité du traitement »

De plus l'obligation pour le pétitionnaire d'informer l'autorité compétente en cas d'effet inattendu ou nocif, et notamment l'apparition de résistance est inscrite dans le règlement biocide (article 47, alinéa b). Il est proposé que cette obligation soit également rappelée dans le RCP du produit:

« En cas de non efficacité du traitement, le responsable de la mise sur le marché devra en informer l'autorité compétente. »

7.2 Suivi post autorisation ou post approbation

Selon le Règlement Biocide, l'annexe VI précise :

« Si une résistance ou une résistance croisée à la substance active contenue dans le produit biocide est susceptible de se développer, l'organisme évaluateur prend des mesures afin de réduire au minimum les conséquences de cette résistance. Les mesures possibles comprennent la modification des conditions d'octroi d'une autorisation. Cependant, si le développement d'une résistance ou d'une résistance croisée ne

peut être suffisamment réduit, l'organisme évaluateur conclut que le produit biocide ne satisfait pas au critère énoncé à l'article 19, paragraphe 1, point b) ii) ».

Suite à l'évaluation du risque de résistance dans le cadre d'un dossier d'AMM ou dossier d'approbation de substance active, des études de laboratoire ou une analyse de la littérature scientifique peuvent mettre en évidence, une suspicion de résistance ou de résistance croisée à d'autres antibactériens (antibiotiques ou autres biocides). Dans ce cas, une gestion de la résistance doit alors être envisagée. Il peut être alors demandé de mettre en place des expérimentations complémentaires en post-approbation, (dans le cadre de l'approbation d'une substance active) ou post-AMM (lors de la mise sur le marché d'un produit).

Des expérimentations en laboratoire seront demandées dans un premier temps, puis des suivis sur le terrain pourront être requis s'il est confirmé un phénomène de résistance suite aux expérimentations de laboratoire.

Sur la base des connaissances scientifiques actuelles, rappelées plus avant dans ce rapport, il est constaté que lors de l'utilisation de ces produits biocides le développement de phénomènes d'adaptation, au moins chez les bactéries visées par les revendications, n'est pas un phénomène rare, tout en rappelant aussi qu'ils sont essentiellement déterminés lors d'expérimentations au laboratoire. Dans le même temps cette adaptation peut conduire à une véritable résistance, c'est-à-dire une survie (lors de la recherche d'un effet bactéricide) ou une multiplication (lors de la recherche d'un effet bactériostatique) alors que les conditions d'applications revendiquées par le pétitionnaire sont respectées.

En conséquence, cette gestion de la résistance bactérienne vis-à-vis des biocides antibactériens doit envisager des réflexions sur trois plans :

- 1- L'analyse des conséquences liées aux phénomènes observés suite aux expérimentations en laboratoire ;
- 2- La décision de développer ou non des expérimentations sur le terrain ;
- 3- Le besoin de mettre en place une surveillance spécifique à l'usage d'un produit donné sur une période suffisamment longue.

Ainsi, il est important de prendre en compte la nature des conclusions tirées de l'application des différentes méthodologies décrites plus haut dans ce rapport au chapitre 6. En effet, schématiquement, deux niveaux de conclusions sont rendus :

- (1) Soit la ou les résistances bactériennes, vis-à-vis du biocide étudié, croisée(s) ou pas avec d'autres biocides ou antibiotiques, sont obtenues dans des conditions respectant celles autorisées. Dans ce cas, les conclusions tirées de l'application des méthodologies, retenues par les pétitionnaires et validées par les autorités compétentes, devront être confirmées sur le terrain. Cette confirmation suppose la mise en place d'expérimentations « terrain » extrêmement rigoureuses et pour laquelle un certain nombre de réflexions et de pistes sont développés ci-après.
- (2) Soit la ou les résistances bactériennes, vis-à-vis du biocide étudié, croisée(s) ou non avec d'autres biocides ou antibiotiques, sont obtenues dans des conditions qui ne respectent pas les conditions d'emploi autorisées (sub-concentration d'emploi ou, et concentration résiduelles suite à une mauvaise élimination du produit) : le pétitionnaire, doit tout mettre en œuvre pour informer les utilisateurs de ces risques et les conseiller afin de respecter strictement les conditions d'application du produit, et si ces phénomènes se déclenchent à des niveaux résiduels les orienter vers le choix de méthodes de contrôle adaptées.

7.3 Suivis sur le terrain

Contrairement aux études conduites au niveau du laboratoire, celles décrites sur le terrain ciblant la résistance aux biocides sont peu nombreuses. Une majorité des études portant sur le sujet de la résistance aux biocides sont associées à la résistance aux antibiotiques. Sans être exhaustif, un certain nombre de travaux réalisés sur le terrain ou à partir de souches prélevées du terrain dans divers environnements et divers pays sont cités ci-après :

Très majoritairement, les travaux développés concernent la recherche d'un certain nombre de gènes de résistance attribués à un certain nombre de biocides soit ponctuellement à partir d'isolats prélevés sur différents sites ou sur un seul site, soit dans le cadre d'une surveillance sur une période donnée.

La présence de ces gènes peut être, suivant les auteurs, corrélée avec les valeurs de CMI. Pour des études plus anciennes, seules les CMI étaient suivies. Dans quasiment tous les cas la recherche de lien est faite avec le niveau de résistance aux antibiotiques :

- Ainsi, Vali et al (2008) ont travaillé sur 120 isolats cliniques de SARM prélevés sur différents sites de soin et constaté une augmentation de CMI aux antibiotiques en révélant la présence de gènes de résistance aux biocides et à certains antibiotiques (Vali et al. 2008).
- Ben Saida et al (2009) ont constaté à partir de 46 isolats cliniques de *Staphylococcus haemolyticus* résistants à la méticilline (SHRM) isolés chez des nouveaux nés hospitalisés, une présence forte de gènes *qac A/B*. (Ben Saida et al. 2009).
- Wang et al (2007) ont étudié la distribution du gène *qac E Δ 1* dans 331 isolats de *Pseudomonas aeruginosa* provenant de 10 hôpitaux chinois (Wang et al. 2007).
- Bjorland et al (2005) en Norvège ont observé une forte prévalence de gènes *qac* chez des staphylocoques provenant de vaches et chèvres laitières supposant une pression de sélection et une diffusion de plasmides portant ces gènes (Bjorland et al. 2005).
- Miyazaki et al (2007), au Brésil ont mis en évidence la présence de gènes *qac A/B* chez 80% des 74 isolats de *Staphylococcus aureus* provenant de différents hôpitaux (Miyazaki et al. 2007).
- Noguchi et al (1999, 2005, 2006) ont étudié la prévalence des gènes *qac A/B* et *smr* chez *Staphylococcus aureus* notamment en travaillant sur 894 isolats provenant de 10 pays asiatiques, constatant par ailleurs la faible augmentation de CMI vis-à-vis des biocides (QACs) et un lien avec la résistance aux antibiotiques (Noguchi et al. 1999, Noguchi et al. 2005, Noguchi et al. 2006). Ce même auteur (2002) a aussi étudié la fréquence de génération de mutants mdr avec des QACs et la fluoroquinolone, mutation qui se produit dans la région entre le promoteur et la région structurale du gène *NorA* (Noguchi et al. 2002).
- Dans des travaux plus anciens les seules CMI étaient utilisées afin d'établir un lien entre antibiotiques et biocides (Reverdy et al. 1993, Heir, Sundheim, et Holck 1995). D'autres auteurs récupérant des isolats cliniques qu'ils ont ensuite exposés une fois pendant des durées différentes ont pu obtenir des valeurs de CMB supérieures aux doses d'emploi pour des produits à base d'ammonium quaternaire ou de PVP-I (Liu et al. 2009).

Ces quelques travaux, dits de « terrain » présentés de manière synthétique démontrent que, en préalable à toutes mesures de gestion de la résistance, il est essentiel de confirmer sur le terrain le développement de résistance à l'usage spécifique d'un produit biocide pour lequel des suspicions de développement de résistance ou, et résistance croisée ont pu être établies en conclusions des expérimentations réalisées au laboratoire. Pour cela, il sera important à partir d'un ou plusieurs sites de maîtriser l'application du produit étudié et d'envisager le suivi des populations bactériennes de terrain sur plusieurs semaines à plusieurs mois dans des zones où le produit est utilisé strictement selon ses conditions d'emploi autorisées. La caractérisation des souches présentes et leur suivi en termes de niveau de sensibilité devra se faire à l'aide des techniques les plus appropriées aux activités revendiquées.

8 Conclusions du groupe de travail

Le règlement Biocides stipule qu'il est nécessaire de s'assurer que chaque substance active approuvée ou produit biocide mis sur le marché n'induit pas d'effet inacceptable sur les organismes cibles en particulier une résistance ou une résistance croisée.

En l'absence de lignes directrices traitant du sujet de la résistance notamment pour les biocides antibactériens, il s'avère nécessaire de proposer une démarche d'évaluation de ce phénomène de résistance afin d'aider, autant les autorités compétentes que les pétitionnaires, à répondre aux exigences définies en différents points du règlement Biocides.

Les travaux du GT « Résistance aux biocides antimicrobiens » ont mené à la proposition d'une approche méthodologique afin d'évaluer la résistance bactérienne à l'usage des biocides antibactériens. Cette approche, à adapter au cas par cas, doit permettre d'évaluer la capacité des bactéries à s'adapter à un biocide antibactérien, à confirmer si ce phénomène de résistance est stable et de mesurer la stabilité et le niveau de cette résistance à ce biocide.

Un exemple d'arbre décisionnel pour une mise en œuvre pratique est proposé. De manière générale, afin de prévenir l'apparition de résistance, il convient de limiter les mésusages pouvant notamment conduire à l'exposition des bactéries cibles à des concentrations sub-létales favorisant leur adaptation. Ainsi un ensemble d'instructions d'utilisation génériques indiquées dans l'AMM sont proposées. De plus, s'il est constaté que l'utilisation est susceptible de conduire au développement de phénomènes de résistance, une gestion de cette résistance doit être envisagée en considérant, au cas par cas, le besoin de développer ou non des expérimentations sur le terrain, voire de mettre en place une surveillance spécifique à l'usage d'un produit donné sur une période suffisamment longue.

Les travaux du GT « Résistance aux biocides antibactériens », proposant une démarche d'évaluation de la capacité d'un biocide antibactérien à engendrer une résistance ou une résistance croisée chez les espèces cibles, seront présentés au niveau Européen, au sein du groupe de travail « Efficacité » de l'ECHA, afin que des lignes directrices européennes qui serait applicables par les pétitionnaires dans le cadre des demandes d'AMM ou d'approbation de substances actives soient établies et prises en compte dans l'évaluation des dossiers biocides.

9 Bibliographie

9.1 Publication

- Aiello, A. E., et E. Larson. 2003. "Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community." *Lancet Infect Dis* 3 (8):501-6.
- Aiello, A. E., E. L. Larson, et S. B. Levy. 2007. "Consumer antibacterial soaps: effective or just risky?" *Clin Infect Dis* 45 Suppl 2:S137-47. doi: 10.1086/519255.
- Alam, M. M., N. Kobayashi, N. Uehara, et N. Watanabe. 2003. "Analysis on distribution and genomic diversity of high-level antiseptic resistance genes qacA and qacB in human clinical isolates of *Staphylococcus aureus*." *Microb Drug Resist* 9 (2):109-21. doi: 10.1089/107662903765826697.
- Alexandre, B.; H.; Mathieu, et C Charpentier. 1996. "Alteration in membrane fluidity and composition in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid and modulation of atpase activity." *Microbiology* 142:469–475.
- Alonso-Hernando, A., R. Capita, M. Prieto, et C. Alonso-Calleja. 2009. "Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants." *Food Control* 20:1108-1111.
- Apostolov, K. 1980. "The effects of iodine on the biological activities of myxoviruses." *J Hyg (Lond)* 84 (3):381-8. doi: 10.1017/s0022172400026905.
- Banerjee, A., E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K. S. Um, T. Wilson, D. Collins, G. de Lisle, et W. R. Jacobs, Jr. 1994. "inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*." *Science* 263 (5144):227-30. doi: 10.1126/science.8284673.
- Barker, J., M. R. Brown, P. J. Collier, I. Farrell, et P. Gilbert. 1992. "Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation." *Appl Environ Microbiol* 58 (8):2420-5.
- Barry, A. L., et S. D. Brown. 1999. "Parameters for quality control of antimicrobial susceptibility tests of roxithromycin." *Clin Microbiol Infect* 5 (4):233-234.
- Bauer, T. J. 2013. "Comparison of chlorine and ammonia concentration field trial data with calculated results from a Gaussian atmospheric transport and dispersion model." *J Hazard Mater* 254-255:325-335. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.04.002.
- Ben Saida, N., M. Marzouk, A. Ferjeni, et J. Boukadida. 2009. "A three-year surveillance of nosocomial infections by methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in newborns reveals the disinfectant as a possible reservoir." *Pathol Biol (Paris)* 57 (3):e29-35. doi: 10.1016/j.patbio.2008.02.019.
- Berk, S. G., R. S. Ting, G. W. Turner, et R. J. Ashburn. 1998. "Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp." *Appl Environ Microbiol* 64 (1):279-86.
- Bjorland, J., T. Steinum, B. Kvitle, S. Waage, M. Sunde, et E. Heir. 2005. "Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway." *J Clin Microbiol* 43 (9):4363-8. doi: 10.1128/JCM.43.9.4363-4368.2005.
- Block, S. S. 1991. "Peroxygen compounds." Dans *Disinfection, sterilization, and preservation*, édité par S. S. Block, 167-181. Philadelphia, Pa.: Lea & Febiger.
- Bloomfield, S. F. 1996. *Chlorine and iodine formulations*. Marcel
- Dekker, Inc ed. New York, N.Y.
- Bloomfield, S. F., et M. Arthur. 1992. "Interaction of *Bacillus subtilis* spores with sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and chloramine-T." *J Appl Bacteriol* 72 (2):166-72.
- Braoudaki, M., et A. C. Hilton. 2005. "Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan." *Int J Antimicrob Agents* 25 (1):31-7. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.07.016.
- Bridier, A., R. Briandet, V. Thomas, et F. Dubois-Brissonnet. 2011. "Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review." *Biofouling* 27 (9):1017-32. doi: 10.1080/08927014.2011.626899.
- Bridier, A., P. Sanchez-Vizuetel, D. Le Coq, S. Aymerich, T. Meylheuc, J. Y. Maillard, V. Thomas, F. Dubois-Brissonnet, et R. Briandet. 2012. "Biofilms of a *Bacillus subtilis* hospital isolate protect *Staphylococcus aureus* from biocide action." *PLoS ONE* 7 (9):e44506. doi: 10.1371/journal.pone.0044506.
- Brozel, V. S., et T. E. Cloete. 1994. "Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to isothiazolone." *J Appl Bacteriol* 76 (6):576-82.
- Capita, R., F. Riesco-Pelaez, A. Alonso-Hernando, et C. Alonso-Calleja. 2014. "Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm,

- resistance to antimicrobials, and ultrastructure." *Appl Environ Microbiol* 80 (4):1268-80. doi: 10.1128/aem.02283-13.
- Cerf, O., B. Carpentier, et and P. Sanders. 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* 136:247-54.
- Chang, S. L. 1971. "Modern concept of disinfection." *J. Sanit. Eng. Div. Proc. ASCE* 97 (689).
- Chao, Y., L. Ma, Y. Yang, F. Ju, X. X. Zhang, W. M. Wu, et T. Zhang. 2013. "Metagenomic analysis reveals significant changes of microbial compositions and protective functions during drinking water treatment." *Sci Rep* 3:3550. doi: 10.1038/srep03550.
- Chesney, J. A., J. W. Eaton, et J. R. Mahoney, Jr. 1996. "Bacterial glutathione: a sacrificial defense against chlorine compounds." *J Bacteriol* 178 (7):2131-5. doi: 10.1128/jb.178.7.2131-2135.1996.
- Chindera, K., M. Mahato, A. K. Sharma, H. Horsley, K. Kloc-Muniak, N. F. Kamaruzzaman, S. Kumar, A. McFarlane, J. Stach, T. Bentin, et L. Good. 2016. "The antimicrobial polymer PHMB enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes." *Sci Rep* 6:23121. doi: 10.1038/srep23121.
- Christensen, E. G., L. Gram, et V. G. Kastbjerg. 2011. "Sublethal triclosan exposure decreases susceptibility to gentamicin and other aminoglycosides in *Listeria monocytogenes*." *Antimicrob Agents Chemother* 55 (9):4064-71. doi: 10.1128/aac.00460-11.
- Ciusa, M. L., L. Furi, D. Knight, F. Decorosi, M. Fondi, C. Raggi, J. R. Coelho, L. Aragonés, L. Moce, P. Visa, A. T. Freitas, L. Baldassarri, R. Fani, C. Viti, G. Orefici, J. L. Martínez, I. Morrissey, et M. R. Oggioni. 2012. "A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*." *Int J Antimicrob Agents* 40 (3):210-20. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.04.021.
- Cloete, T.E. 2003. "Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobials compounds." *International biodeterioration and biodegradation* 51:277-82.
- Collier, P. J., A. J. Ramsey, P. Austin, et P. Gilbert. 1990 (b). "Growth inhibitory and biocidal activity of some isothiazolone biocides." *J Appl Bacteriol* 69 (4):569-77.
- Collier, P. J., A. Ramsey, R. D. Waigh, K. T. Douglas, P. Austin, et P. Gilbert. 1990 (a). "Chemical reactivity of some isothiazolone biocides." *J Appl Bacteriol* 69 (4):578-84.
- Condell, O., C. Iversen, S. Cooney, K. A. Power, C. Walsh, C. Burgess, et S. Fanning. 2012. "Efficacy of biocides used in the modern food industry to control salmonella enterica, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds." *Appl Environ Microbiol* 78 (9):3087-97. doi: 10.1128/aem.07534-11.
- Cowley, N. L., S. Forbes, A. Amezcua, P. McClure, G. J. Humphreys, et A. J. McBain. 2015. "Effects of Formulation on Microbiocide Potency and Mitigation of the Development of Bacterial Insusceptibility." *Appl Environ Microbiol* 81 (20):7330-8. doi: 10.1128/aem.01985-15.
- Curiao, T., E. Marchi, D. Grandgirard, R. Leon-Sampedro, C. Viti, S. L. Leib, F. Baquero, M. R. Oggioni, J. L. Martínez, et T. M. Coque. 2016. "Multiple adaptive routes of *Salmonella enterica* Typhimurium to biocide and antibiotic exposure." *BMC Genomics* 17:491. doi: 10.1186/s12864-016-2778-z.
- Davison, Helen C., Mark E. J. Woolhouse, et and J. Chris Low. 2000. "What is antibiotic resistance and how can we measure it?" *Trends in microbiology* 8:554-59.
- Declerck, P., J. Behets, V. van Hoef, et F. Ollevier. 2007. "Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments." *Water Res* 41 (14):3159-67. doi: 10.1016/j.watres.2007.04.011.
- Denyer, S.P. 1995. "Mechanisms of action of antibacterial biocides." *International biodeterioration and biodegradation*:227-245.
- Di Cesare, A., D. Fontaneto, J. Doppelbauer, et G. Corno. 2016. "Fitness and Recovery of Bacterial Communities and Antibiotic Resistance Genes in Urban Wastewaters Exposed to Classical Disinfection Treatments." *Environ Sci Technol* 50 (18):10153-61. doi: 10.1021/acs.est.6b02268.
- Dubois-Brissonnet, F., C. Ntsama, J.Y. Leveau, et J. Fourniat. 1995. "Activite bactéricide de six désinfectants sur des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* obtenus en conditions statiques." Dans *Adhésion des microorganismes aux surfaces*, 295-304. Paris (France): Lavoisier.
- Dubois-Brissonnet, F., M. Naitali, A. A. Mafu, et R. Briandet. 2011. "Induction of fatty acid composition modifications and tolerance to biocides in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by plant-derived terpenes." *Appl Environ Microbiol* 77 (3):906-10. doi: 10.1128/aem.01480-10.
- Dukan, S., S. Dadon, D. R. Smulski, et S. Belkin. 1996. "Hypochlorous acid activates the heat shock and soxRS systems of *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol* 62 (11):4003-8.
- Dupuy, M., S. Mazoua, F. Berne, C. Bodet, N. Garrec, P. Herbelin, F. Menard-Szczebara, S. Oberti, M. H. Rodier, S. Soreau, F. Wallet, et Y. Hechard. 2011. "Efficiency of water disinfectants against

- Legionella pneumophila and Acanthamoeba." *Water Res* 45 (3):1087-94. doi: 10.1016/j.watres.2010.10.025.
- Dychdala, Cords et. 1993. "Sanitizers: halogens, surface-active agent, and peroxides." Dans *Antimicrobials in foods*, édité par Davidson PM In: Branen AL, 499-502. New York: Marcel Dekker.
- Ekwanzala, M. D., J. B. Dewar, I. Kamika, et M. N. B. Momba. 2018. "Systematic review in South Africa reveals antibiotic resistance genes shared between clinical and environmental settings." *Infect Drug Resist* 11:1907-1920. doi: 10.2147/idr.S170715.
- Er, B., B. Demirhan, F. K. Onurdag, S. O. Ozgacar, et A. B. Oktem. 2014. "Antimicrobial and antibiofilm effects of selected food preservatives against Salmonella spp. isolated from chicken samples." *Poult Sci* 93 (3):695-701. doi: 10.3382/ps.2013-03404.
- Fernández-Fuentes, M.A, E Ortega Morente, M.J.; Abriouel, R.P Pulido, et A Gálvez. 2014. "Antimicrobial resistance determinants in antibiotic and biocide-resistant gram-negative bacteria from organic foods." *Food Control* 37:9-14.
- Fernandez, A., E. Soriano, P. Hernandez-Munoz, et R. Gavara. 2010. "Migration of antimicrobial silver from composites of polylactide with silver zeolites." *J Food Sci* 75 (3):E186-93. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01549.x.
- Fernandez Marquez, M. L., M. J. Grande Burgos, M. C. Lopez Aguayo, R. Perez Pulido, A. Galvez, et R. Lucas. 2017. "Characterization of biocide-tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises." *Food Microbiol* 62:77-81. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.008.
- Ferrarese, L., R. Paglia, et A Chhirardini. 2003. "Bacterial resistance in cosmetics industrial plant: connected problems and their solution." *Annals of Microbiology*, 53 (4):477-490.
- Flach, C. F., C. Pal, C. J. Svensson, E. Kristiansson, M. Ostman, J. Bengtsson-Palme, M. Tysklind, et D. G. J. Larsson. 2017. "Does antifouling paint select for antibiotic resistance?" *Sci Total Environ* 590-591:461-468. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.213.
- Forbes, S., C. B. Dobson, G. J. Humphreys, et A. J. McBain. 2014. "Transient and sustained bacterial adaptation following repeated sublethal exposure to microbicides and a novel human antimicrobial peptide." *Antimicrob Agents Chemother* 58 (10):5809-17. doi: 10.1128/aac.03364-14.
- Frank, J. F., et R. A. Koffi. 1990. "Surface-adherent Growth of Listeria monocytogenes is Associated with Increased Resistance to Surfactant Sanitizers and Heat." *J Food Prot* 53 (7):550-554. doi: 10.4315/0362-028x-53.7.550.
- Gadea, R., M. A. Fernandez Fuentes, R. Perez Pulido, A. Galvez, et E. Ortega. 2017. "Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods." *Food Microbiol* 63:58-71. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.037.
- Gilbert, P; , et and A.J. McBain. 2003. "Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance." *Clinical microbiology reviews* 16:189+.
- Giuliano, C. A., et M. J. Rybak. 2015. "Efficacy of triclosan as an antimicrobial hand soap and its potential impact on antimicrobial resistance: a focused review." *Pharmacotherapy* 35 (3):328-36. doi: 10.1002/phar.1553.
- Gnanadhas, D. P., S. A. Marathe, et D. Chakravorty. 2013. "Biocides--resistance, cross-resistance mechanisms and assessment." *Expert Opin Investig Drugs* 22 (2):191-206. doi: 10.1517/13543784.2013.748035.
- Gottardi, W. 1991. "Iodine and iodine compounds,," Dans *Disinfection, sterilization, and preservation*, édité par Lea & Febiger, 152-166. Philadelphia, Pa: In S. S. Block.
- Greub, G., et D. Raoult. 2004. "Microorganisms resistant to free-living amoebae." *Clin Microbiol Rev* 17 (2):413-33. doi: 10.1128/cmr.17.2.413-433.2004.
- Grobe, K. J., J. Zahller, et P. S. Stewart. 2002. "Role of dose concentration in biocide efficacy against Pseudomonas aeruginosa biofilms." *J Ind Microbiol Biotechnol* 29 (1):10-5. doi: 10.1038/sj.jim.7000256.
- Guerin-Mechin, L., F. Dubois-Brissonnet, B. Heyd, et J. Y. Leveau. 1999. "Specific variations of fatty acid composition of Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 induced by quaternary ammonium compounds and relation with resistance to bactericidal activity." *J Appl Microbiol* 87 (5):735-42.
- Guerin-Mechin, L., F. Dubois-Brissonnet, B. Heyd, et J. Y. Leveau. 2000. "Quaternary ammonium compound stresses induce specific variations in fatty acid composition of Pseudomonas aeruginosa." *Int J Food Microbiol* 55 (1-3):157-9.
- Gullberg, E., S. Cao, O. G. Berg, C. Ilback, L. Sandegren, D. Hughes, et D. I. Andersson. 2011. "Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations." *PLoS Pathog* 7 (7):e1002158. doi: 10.1371/journal.ppat.1002158.
- Haley, C. E., M. Marling-Cason, J. W. Smith, J. P. Luby, et P. A. Mackowiak. 1985. "Bactericidal activity of antiseptics against methicillin-resistant Staphylococcus aureus." *J Clin Microbiol* 21 (6):991-2.

- Harrison, J. J., H. Ceri, N. J. Roper, E. A. Badry, K. M. Sproule, et R. J. Turner. 2005. "Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*." *Microbiology* 151 (Pt 10):3181-95. doi: 10.1099/mic.0.27794-0.
- Hausner, M., et S. Wuertz. 1999. "High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis." *Appl Environ Microbiol* 65 (8):3710-3.
- Hay, A. G., P. M. Dees, et G. S. Saylor. 2001. "Growth of a bacterial consortium on triclosan." *FEMS Microbiol Ecol* 36 (2-3):105-112. doi: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00830.x.
- Heath, R. J., J. R. Rubin, D. R. Holland, E. Zhang, M. E. Snow, et C. O. Rock. 1999. "Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis." *J Biol Chem* 274 (16):11110-4. doi: 10.1074/jbc.274.16.11110.
- Heir, E., G. Sundheim, et A. L. Holck. 1995. "Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827." *J Appl Bacteriol* 79 (2):149-56.
- Hilbi, H., C. Hoffmann, et C. F. Harrison. 2011. "Legionella spp. outdoors: colonization, communication and persistence." *Environ Microbiol Rep* 3 (3):286-96. doi: 10.1111/j.1758-2229.2011.00247.x.
- Hoang, T. T., et HP. Schweizer. 1999. "Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase (FabI): a Target for the Antimicrobial Triclosan and Its Role in Acylated Homoserine Lactone Synthesis." *BACTERIOLOGY* 181 (17):5489-5497.
- Hugo, W. B. 1967. "The mode of action of antibacterial agents." *J Appl Bacteriol* 30 (1):17-50.
- Irizarry, L., T. Merlin, J. Rupp, et J. Griffith. 1996. "Reduced susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to cetylpyridinium chloride and chlorhexidine." *Chemotherapy* 42 (4):248-52. doi: 10.1159/000239451.
- Kaehn, K. 2010. "Polihexanide: a safe and highly effective biocide." *Skin Pharmacol Physiol* 23 Suppl:7-16. doi: 10.1159/000318237.
- Karpanen, T. J., T. Worthington, E. R. Hendry, B. R. Conway, et P. A. Lambert. 2008. "Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*." *J Antimicrob Chemother* 62 (5):1031-6. doi: 10.1093/jac/dkn325.
- Khan, S., T. K. Beattie, et C. W. Knapp. 2016. "Relationship between antibiotic- and disinfectant-resistance profiles in bacteria harvested from tap water." *Chemosphere* 152:132-41. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.02.086.
- Khan, S., T. K. Beattie, et C. W. Knapp. 2017. "The use of minimum selectable concentrations (MSCs) for determining the selection of antimicrobial resistant bacteria." *Ecotoxicology* 26 (2):283-292. doi: 10.1007/s10646-017-1762-y.
- Knapp, L., A. Amezcua, P. McClure, S. Stewart, et J. Y. Maillard. 2015. "Development of a protocol for predicting bacterial resistance to microbicides." *Appl Environ Microbiol* 81 (8):2652-9. doi: 10.1128/aem.03843-14.
- Kraus, D., et A. Peschel. 2008. "Staphylococcus aureus evasion of innate antimicrobial defense." *Future Microbiol* 3 (4):437-51. doi: 10.2217/17460913.3.4.437.
- Kruse, W. C. 1970. "Halogen action on bacteria, viruses and protozoa." Proceedings of the National Special Conference on Disinfection, Amherst, Mass.
- Kulikovskiy, A., H. S. Pankratz, et H. L. Sadoff. 1975. "Ultrastructural and chemical changes in spores of *Bacillus cereus* after action of disinfectants." *J Appl Bacteriol* 38 (1):39-46.
- Langsrud, S. 2003. "Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry." *International biodeterioration and biodegradation* 51:289-90.
- Larson, E. L., et and H. E. Morton. 1991. *Alcohols*. 4th ed. Lea & Febiger ed. Philadelphia, Pa.
- Lavilla Lerma, L., N. Benomar, C. Casado Munoz Mdel, A. Galvez, et H. Abriouel. 2015. "Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* spp. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production." *Food Microbiol* 51:33-44. doi: 10.1016/j.fm.2015.04.010.
- Lensing, H. H., et H. L. Oei. 1984. "Study of the efficiency of disinfectants against antrax spores." *Tijdschr. Diergeneeskde* 109:557-563.
- Levy, S. B. 2001. "Antibacterial household products: cause for concern." *Emerg Infect Dis* 7 (3 Suppl):512-5. doi: 10.3201/eid0707.017705.
- Liu, Q., M. Liu, Q. Wu, C. Li, T. Zhou, et Y. Ni. 2009. "Sensitivities to biocides and distribution of biocide resistance genes in quaternary ammonium compound tolerant *Staphylococcus aureus* isolated in a teaching hospital." *Scand J Infect Dis* 41 (6-7):403-9. doi: 10.1080/00365540902856545.
- Loret, J. F., et G. Greub. 2010. "Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment." *Int J Hyg Environ Health* 213 (3):167-75. doi: 10.1016/j.ijheh.2010.03.004.

- Luppens, S. B., M. W. Reij, R. W. van der Heijden, F. M. Rombouts, et T. Abee. 2002. "Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants." *Appl Environ Microbiol* 68 (9):4194-200. doi: 10.1128/aem.68.9.4194-4200.2002.
- Maillard, J. Y. 2007. "Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern?" *Journal of hospital infection* 65:60-72.
- Maillard, J. Y., et P. Hartemann. 2013 (b). "Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge." *Crit Rev Microbiol* 39 (4):373-83. doi: 10.3109/1040841x.2012.713323.
- Maillard, J.Y., S. Bloomfield, J.R. Coelho, Collier P, Cookson B, Fanning S, Hill A, Hartemann P, McBain AJ, Oggioni M, Sattar S, Schweizer HP, et and Threlfall J. 2013 (a). "Does microbicide use in consumer products promote antimicrobial resistance? A critical review and recommendations for a cohesive approach to risk assessment." *Microbial Drug Resistance* 19.
- Malchesky, P. S. 1993. "Peracetic acid and its application to medical instrument sterilization." *Artif. Organs* 17:147-152.
- Maris, P. 1991. "[Resistance of 700 gram-negative bacterial strains to antiseptics and antibiotics]." *Ann Rech Vet* 22 (1):11-23.
- Martinez, J. 2005. "Mode of action and development of resistance to disinfectants, Part 1." *Bioprocess Technical International*:32-38.
- Mazzola, P. G., A. M. Martins, et T. C. Penna. 2006. "Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system." *BMC Infect Dis* 6:131. doi: 10.1186/1471-2334-6-131.
- Mc Cay, P. H., A. A. Ocampo-Sosa, et G. T. Fleming. 2010. "Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture." *Microbiology* 156 (Pt 1):30-8. doi: 10.1099/mic.0.029751-0.
- McBain, A. J., R. G. Bartolo, C. E. Catrenich, D. Charbonneau, R. G. Ledder, A. H. Rickard, S. A. Symmons, et P. Gilbert. 2003. "Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms." *Appl Environ Microbiol* 69 (1):177-85. doi: 10.1128/aem.69.1.177-185.2003.
- McBain, A. J., R. G. Ledder, L. E. Moore, C. E. Catrenich, et P. Gilbert. 2004. "Effects of quaternary-ammonium-based formulations on bacterial community dynamics and antimicrobial susceptibility." *Appl Environ Microbiol* 70 (6):3449-56. doi: 10.1128/aem.70.6.3449-3456.2004.
- McDonnell. 1999. "Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance." *Clinical microbiology reviews* 12 (1):147-179.
- Meade, M. J., R. L. Waddell, et T. M. Callahan. 2001. "Soil bacteria *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans* inactivate triclosan in liquid and solid substrates." *FEMS Microbiol Lett* 204 (1):45-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10860.x.
- Meier, A. B., C. Guldemann, A. Markkula, A. Pontinen, H. Korkeala, et T. Tasara. 2017. "Comparative Phenotypic and Genotypic Analysis of Swiss and Finnish *Listeria monocytogenes* Isolates with Respect to Benzalkonium Chloride Resistance." *Front Microbiol* 8:397. doi: 10.3389/fmicb.2017.00397.
- Mir, J., J. Morato, et F. Ribas. 1997. "Resistance to chlorine of freshwater bacterial strains." *J Appl Microbiol* 82 (1):7-18.
- Miyazaki, N. H., A. O. Abreu, V. A. Marin, C. A. Rezende, M. T. Moraes, et M. H. Villas Boas. 2007. "The presence of *qacA/B* gene in Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (4):539-40. doi: 10.1590/s0074-02762007000400018.
- Moore, L. E., R. G. Ledder, P. Gilbert, et A. J. McBain. 2008. "In vitro study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility." *Appl Environ Microbiol* 74 (15):4825-34. doi: 10.1128/aem.00573-08.
- Moretro, T., B. C. T. Schirmer, E. Heir, A. Fagerlund, P. Hjemli, et S. Langsrud. 2017. "Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry." *Int J Food Microbiol* 241:215-224. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.025.
- Morrissey, I., M. R. Oggioni, D. Knight, T. Curiao, T. Coque, A. Kalkanci, J. L. Martinez, L. Baldassarri, G. Orefici, Ü Yetiş, H. J. Rödger, P. Visa, D. Mora, S. Leib, et and C. Viti. 2014. "Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms." *PLoS ONE* 9 (1).
- Morton, H. E. 1983. *Alcohols*. 3rd ed. Lea & Febiger ed. Philadelphia, Pa.
- Mullapudi, S., R. M. Siletsky, et and S. Kathariou. 2008. "Heavy-metal and benzalkonium chloride resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from the environment of turkey-processing plants." *Appl Environ Microbiol* 74 (5):1464-1468.
- Newton, H. J., D. K. Ang, I. R. van Driel, et E. L. Hartland. 2010. "Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*." *Clin Microbiol Rev* 23 (2):274-98. doi: 10.1128/cmr.00052-09.

- Nishihara, T., T. Okamoto, et N. Nishiyama. 2000. "Biodegradation of didecyldimethylammonium chloride by *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge." *J Appl Microbiol* 88 (4):641-7.
- Noguchi, N., M. Hase, M. Kitta, M. Sasatsu, K. Deguchi, et M. Kono. 1999. "Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *FEMS Microbiol Lett* 172 (2):247-53. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13475.x.
- Noguchi, N., H. Nakaminami, S. Nishijima, I. Kurokawa, H. So, et M. Sasatsu. 2006. "Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome." *J Clin Microbiol* 44 (6):2119-25. doi: 10.1128/jcm.02690-05.
- Noguchi, N., J. Suwa, K. Narui, M. Sasatsu, T. Ito, K. Hiramatsu, et J. H. Song. 2005. "Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes *qacA/B* and *smr* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999." *J Med Microbiol* 54 (Pt 6):557-65. doi: 10.1099/jmm.0.45902-0.
- Noguchi, N., M. Tamura, K. Narui, K. Wakasugi, et M. Sasatsu. 2002. "Frequency and genetic characterization of multidrug-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* after selection with individual antiseptics and fluoroquinolones." *Biol Pharm Bull* 25 (9):1129-32.
- Ntsama-Essomba, C, Ramaldes Bouttier S, M, et J Fourniat. 1995. "Influence de la nature chimique des désinfectants sur leur activité vis-à-vis de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* obtenus en conditions statiques." Dans *Techniques et documentation. Adhésion des microorganismes aux surfaces.*, édité par Fourniat J Bellon- Fontaine MN, 282-294. Paris (France).
- Ntsama-Essomba, C., S. Bouttier, M. Ramaldes, F. Dubois-Brissonnet, et J. Fourniat. 1997. "Resistance of *Escherichia coli* growing as biofilms to disinfectants." *Vet Res* 28 (4):353-63.
- Ortiz, S., V. López, et and J. V. Martínez-Suárez. 2014. "Control of *Listeria monocytogenes* contamination in an Iberian pork processing plant and selection of benzalkonium chloride-resistant strains." *Food Microbiology* 39:81-88.
- Parsek, M. R., et E. P. Greenberg. 2000. "Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (16):8789-93. doi: 10.1073/pnas.97.16.8789.
- Payne, D. N., J. R. Babb, et C. R. Bradley. 1999. "An evaluation of the suitability of the European suspension test to reflect in vitro activity of antiseptics against clinically significant organisms." *Lett Appl Microbiol* 28 (1):7-12.
- Peschel, A., R. W. Jack, M. Otto, L. V. Collins, P. Staubitz, G. Nicholson, H. Kalbacher, W. F. Nieuwenhuizen, G. Jung, A. Tarkowski, K. P. van Kessel, et J. A. van Strijp. 2001. "*Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine." *J Exp Med* 193 (9):1067-76. doi: 10.1084/jem.193.9.1067.
- Pietersen, B, et V. S. Brozel. 1995. "The reaction of bacterial cultures to oxidising water treatment biocides." *Water SA* 21 (2):173-175.
- Poole, K. 2002. "Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance." *J Appl Microbiol* 92 Suppl:55s-64s.
- Potenski, C. J., M. Gandhi, et K. R. Matthews. 2003. "Exposure of *Salmonella* Enteritidis to chlorine or food preservatives decreases [corrected] susceptibility to antibiotics." *FEMS Microbiol Lett* 220 (2):181-6. doi: 10.1016/s0378-1097(03)00099-5.
- Power, E. G., et A. D. Russell. 1989. "Glutaraldehyde: its uptake by sporing and non-sporing bacteria, rubber, plastic and an endoscope." *J Appl Bacteriol* 67 (3):329-42.
- Randall, L. P., S. W. Cooles, N. G. Coldham, E. G. Penuela, A. C. Mott, M. J. Woodward, L. J. Piddock, et and M. A. Webber. 2007. "Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60 (6):1273-1280.
- Reverdy, M. E., M. Bes, Y. Brun, et J. Fleurette. 1993. "[Evolution of resistance to antibiotics and antiseptics of hospital *Staphylococcus aureus* strains isolated from 1980 to 1991]." *Pathol Biol (Paris)* 41 (9):897-904.
- Rhim, J. W., S. I. Hong, H. M. Park, et P. K. Ng. 2006. "Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity." *J Agric Food Chem* 54 (16):5814-22. doi: 10.1021/jf060658h.
- Ricke, S.C. 2003. "Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials." *Poult. Sci* 82:632-639.
- Roberts, M. E., et P. S. Stewart. 2005. "Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells." *Microbiology* 151 (Pt 1):75-80. doi: 10.1099/mic.0.27385-0.

- Russell, A. D. 1991. "Chemical sporicidal and sporostatic agents." Dans *Disinfection, sterilization, and preservation*, édité par S. S. Block, 365-376. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger,.
- Russell, A. D. 2003. "Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations." *Lancet Infect Dis* 3:794-803.
- Russell, A. D. 2002. "Biocides and pharmacologically active drugs as residues and in the environment: is there a correlation with antibiotic resistance?" *Am J Infect Control* 30 (8):495-8.
- Russell, A. D., et M. J. Day. 1996. "Antibiotic and biocide resistance in bacteria." *Microbios* 85 (342):45-65.
- Russell, A.D., et I Chopra. 1990. "Understanding Antibacterial Action and Resistance." *second ed. Ellis Horwood, Chichester, UK.*
- Russell, A.D., et J.-Y Maillard. 2000. "Response." *American journal of infection control* 28 204–206.
- Sabev, H. A., G. D. Robson, et P. S. Handley. 2006. "Influence of starvation, surface attachment and biofilm growth on the biocide susceptibility of the biodeteriogenic yeast *Aureobasidium pullulans*." *J Appl Microbiol* 101 (2):319-30. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03014.x.
- Saby, S., P. Leroy, et J. C. Block. 1999. "Escherichia coli resistance to chlorine and glutathione synthesis in response to oxygenation and starvation." *Appl Environ Microbiol* 65 (12):5600-3.
- Sandegren, L. 2014. "Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations." *Ups J Med Sci* 119 (2):103-7. doi: 10.3109/03009734.2014.904457.
- Sawai, J., H. Igarashi, A. Hashimoto, T. Kokugan, et M and Shimizu. 1995 "Evaluation of growth inhibitory effect of ceramic powder slurry on bacteria by conductance method." *J. Chem. Eng. Jpn* 28:288-293.
- Sharma, V. K., N. Johnson, L. Cizmas, T. J. McDonald, et H. Kim. 2016. "A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes." *Chemosphere* 150:702-714. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.12.084.
- Sheldon, A. T. 2005. "Antiseptic "resistance": Real or perceived threat?" *Clinical Infectious Diseases* 40:1650-56.
- Shrivastava, R., R. K. Upreti, S. R. Jain, K. N. Prasad, P. K. Seth, et U. C. Chaturvedi. 2004. "Suboptimal chlorine treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*." *Ecotoxicol Environ Saf* 58 (2):277-83. doi: 10.1016/s0147-6513(03)00107-6.
- Sidhu, M. S., E. Heir, T. Leegaard, K. Wiger, et A. Holck. 2002. "Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci." *Antimicrob Agents Chemother* 46 (9):2797-803. doi: 10.1128/aac.46.9.2797-2803.2002.
- Soumet, C., E. Fourreau, P. Legrandois, et P. Maris. 2012. "Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*." *Vet Microbiol* 158 (1-2):147-52. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.01.030.
- Steinert, M., G. Ockert, C. Luck, et J. Hacker. 1998. "Regrowth of *Legionella pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system." *Zentralbl Bakteriol* 288 (3):331-42.
- Stratford, M.; , et T. Eklund. 2003. *Organic acids and esters*. Edité par Springer. Springer ed, . Boston, MA, USA.
- Tennen, R., B. Setlow, K. L. Davis, C. A. Loshon, et P. Setlow. 2000. "Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid." *J Appl Microbiol* 89 (2):330-8.
- Thomas, L., J. Y. Maillard, R. J. Lambert, et A. D. Russell. 2000. "Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a "residual" concentration." *J Hosp Infect* 46 (4):297-303. doi: 10.1053/jhin.2000.0851.
- Thomas, V., et G. Greub. 2010. "Amoeba/amoebal symbiont genetic transfers: lessons from giant virus neighbours." *Intervirology* 53 (5):254-67. doi: 10.1159/000312910.
- Tischer, Maximilian, Gabriele Pradel, Knut Ohlsen, et Ulrike Holzgrabe. 2012. "Quaternary Ammonium Salts and Their Antimicrobial Potential: Targets or Nonspecific Interactions?" *ChemMedChem* 7 (1):22-31. doi: 10.1002/cmdc.201100404.
- Trujillo, R., et N. Laible. 1970. "Reversible inhibition of spore germination by alcohols." *Appl Microbiol* 20 (4):620-3.
- Turner, R. J. 2018. "Is Silver the Ultimate Antimicrobial Bullet?" *Antibiotics (Basel)* 7 (4). doi: 10.3390/antibiotics7040112.
- Vali, L., S. E. Davies, L. L. Lai, J. Dave, et S. G. Amyes. 2008. "Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates." *J Antimicrob Chemother* 61 (3):524-32. doi: 10.1093/jac/dkm520.
- van Klingeren, B., et W. Pullen. 1993. "Glutaraldehyde resistant mycobacteria from endoscope washers." *J Hosp Infect* 25 (2):147-9.

- Van Mourik, A., L. Steeghs, J. van Laar, H. D. Meiring, H. J. Hamstra, J. P. van Putten, et M. M. Wosten. 2010. "Altered linkage of hydroxyacyl chains in lipid A of *Campylobacter jejuni* reduces TLR4 activation and antimicrobial resistance." *J Biol Chem* 285 (21):15828-36. doi: 10.1074/jbc.M110.102061.
- Vilain, S., P. Cosette, I. Zimmerlin, J. P. Dupont, G. A. Junter, et T. Jouenne. 2004. "Biofilm proteome: homogeneity or versatility?" *J Proteome Res* 3 (1):132-6.
- Vincent, M., R. E. Duval, P. Hartemann, et M. Engels-Deutsch. 2018. "Contact killing and antimicrobial properties of copper." *J Appl Microbiol* 124 (5):1032-1046. doi: 10.1111/jam.13681.
- Wales, A.D., et and R.H. Woodward. 2015. "Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens." *Antibiotics* 4:567-604.
- Wang, C., P. Cai, Y. Guo, et Z. Mi. 2007. "Distribution of the antiseptic-resistance genes qacEDelta1 in 331 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in China." *J Hosp Infect* 66 (1):93-5. doi: 10.1016/j.jhin.2007.01.012.
- Webber, M. A., L. P. Randall, S. Cooles, M. J. Woodward, et and L. J. V. Piddock. 2008. "Triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *J Antimicrob Chemother* 62.
- Webber, M. A., R. N. Whitehead, M. Mount, N. J. Loman, M. J. Pallen, et L. J. Piddock. 2015. "Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide exposure." *J Antimicrob Chemother* 70 (8):2241-8. doi: 10.1093/jac/dkv109.
- Wesgate, R., P. Grasha, et J. Y. Maillard. 2016. "Use of a predictive protocol to measure the antimicrobial resistance risks associated with biocidal product usage." *Am J Infect Control* 44 (4):458-64. doi: 10.1016/j.ajic.2015.11.009.
- Wesgate, Rebecca, Pierre Grasha, et and Jean-Yves Maillard. 2016. "Use of a predictive protocol to measure the antimicrobial resistance risks associated with biocidal product usage." *American journal of infection control* 44:458-64.
- Whitehead, R. N., T. W. Overton, C. L. Kemp, et M. A. Webber. 2011. "Exposure of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to high level biocide challenge can select multidrug resistant mutants in a single step." *PLoS ONE* 6 (7):e22833. doi: 10.1371/journal.pone.0022833.
- Williams, M. M., et E. B. Braun-Howland. 2003. "Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine." *Appl Environ Microbiol* 69 (9):5463-71. doi: 10.1128/aem.69.9.5463-5471.2003.
- Williams, T.M. 2007. "The mechanism of action of isothiazolone biocide." *Power Plant Chemistry* 9 (1):14-21.
- Winder, C. L., I. S. Al-Adham, S. M. Abdel Malek, T. E. Buultjens, A. J. Horrocks, et P. J. Collier. 2000. "Outer membrane protein shifts in biocide-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *J Appl Microbiol* 89 (2):289-95.

9.2 Normes et guides

9.2.1 Normes

NF X 50-110 (mai 2003) Qualité en expertise- Prescription générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X50-110).

NF EN 1040 (2006) Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de base des antiseptiques et des désinfectants chimiques.

CLSI, ISO20776 : Systèmes d'essais en laboratoire et de diagnostic in vitro – Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes – Partie 1 : Méthodes de référence pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses.

9.2.2 Guides

Technical Notes for Guidance: « Revision of chapter 6.2 (Common principles and Practical procedures for the Authorisation and Registration of Products) of the TNsG on Product Evaluation, and a revision of Chapter 101 (Assessment for the potential for resistance to the active substance) of the TNsG on Annex I Inclusion » (CA-Sept08-Doc.6.2)

Guidance on the Biocidal Products Regulation- Volume II Efficacy – Assessment and Evaluation (Parts B+C)

9.3 Législation et réglementation

Règlement (UE) N°528/2012 du parlement européen et du conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à la disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides.

10 Annexe 1 : Les principaux types de produits¹⁶ concernés par les travaux de l'autosaisine

Numéro	Type de produits	Description
Groupe 1: Désinfectants		
Ces types de produits ne comprennent pas les produits nettoyants qui ne sont pas destinés à avoir un effet biocide, notamment la lessive liquide, la lessive en poudre et les produits similaires.		
TP1	Hygiène humaine	Les produits de cette catégorie sont des produits biocides utilisés pour l'hygiène humaine, appliqués sur la peau humaine ou le cuir chevelu ou en contact avec celle-ci ou celui-ci, dans le but principal de désinfecter la peau ou le cuir chevelu
TP2	Désinfectants et produits algicides non destinés à l'application directe sur des êtres humains ou des animaux	Utilisés pour désinfecter les surfaces, les matériaux, les équipements et le mobilier qui ne sont pas utilisés en contact direct avec les denrées alimentaires ou les aliments pour animaux. Les lieux d'utilisation incluent notamment les piscines, les aquariums, les eaux de bassin et les autres eaux, les systèmes de climatisation, ainsi que les murs et sols dans les lieux privés, publics et industriels et dans d'autres lieux d'activités professionnelles. Utilisés pour désinfecter l'air, les eaux non utilisées pour la consommation humaine ou animale, les toilettes chimiques, les eaux usées, les déchets d'hôpitaux et le sol. Utilisés comme produits algicides pour le traitement des piscines, des aquariums et des autres eaux, ainsi que pour le traitement curatif des matériaux de construction. Utilisés pour être incorporés dans les textiles, les tissus, les masques, les peintures et d'autres articles ou matériaux, afin de produire des articles traités possédant des propriétés désinfectantes.
TP3	Hygiène vétérinaire	Utilisés pour l'hygiène vétérinaire, tels que désinfectants, savons désinfectants, produits d'hygiène buccale ou corporelle ou ayant une fonction antimicrobienne. Utilisés pour désinfecter les matériaux et surfaces associés à l'hébergement ou au transport des animaux.
TP4	Surfaces en contact avec les denrées alimentaires et les aliments pour animaux	Utilisés pour désinfecter le matériel, les conteneurs, les ustensiles de consommation, les surfaces ou conduits utilisés pour la production, le transport, le stockage ou la consommation de denrées alimentaires ou d'aliments pour animaux (y compris l'eau potable) destinés aux hommes ou aux animaux. Utilisés pour l'imprégnation des matériaux susceptibles d'entrer en contact avec des denrées alimentaires.
TP5	Eau potable	Utilisés pour désinfecter l'eau potable destinée aux hommes et aux animaux.

¹⁶ <https://echa.europa.eu/fr/regulations/biocidal-products-regulation/product-types>

Numéro	Type de produits	Description
Groupe 2 : Produits de protection		
Sauf indication contraire, ces types de produits ne concernent que des produits visant à prévenir le développement microbien et le développement des algues.		
TP6	Protection des produits pendant le stockage	Utilisés pour protéger les produits manufacturés, autres que les denrées alimentaires, les aliments pour animaux, les produits cosmétiques, les médicaments ou les dispositifs médicaux, par la maîtrise des altérations microbiennes afin de garantir leur durée de conservation. Utilisés comme produits de protection pour le stockage ou l'utilisation d'appâts rodenticides, insecticides ou autres.
TP7	Produits de protection pour les pellicules	Utilisés pour protéger les pellicules ou les revêtements par la maîtrise des altérations microbiennes ou de la croissance des algues afin de sauvegarder les propriétés initiales de la surface des matériaux ou objets tels que les peintures, les plastiques, les enduits étanches, les adhésifs muraux, les liants, les papiers et les œuvres d'art.
TP9	Produits de protection des fibres, du cuir, du caoutchouc et des matériaux polymérisés	Utilisés pour protéger les matières fibreuses ou polymérisées telles que le cuir, le caoutchouc, le papier ou les produits textiles par la maîtrise des altérations microbiologiques. Ce type de produits comprend les produits biocides qui empêchent l'accumulation de microorganismes sur la surface des matériaux et qui préviennent ou empêchent la formation d'odeurs et/ou qui présentent d'autres types d'avantages.
TP10	Produits de protection des matériaux de construction	Utilisés pour protéger les ouvrages de maçonnerie, les matériaux composites ou les matériaux de construction autres que le bois par la lutte contre les attaques microbiologiques et les algues.
TP11	Produits de protection des liquides utilisés dans les systèmes de refroidissement et de fabrication	Utilisés pour protéger l'eau ou les autres liquides utilisés dans les systèmes de refroidissement et de fabrication par la lutte contre les organismes nuisibles tels que les microbes, les algues et les moules. Les produits utilisés pour désinfecter l'eau potable ou l'eau des piscines ne sont pas compris dans ce type de produits.
TP12	Produits anti-biofilm	Utilisés pour prévenir ou lutter contre la formation d'un biofilm sur les matériaux, équipements et structures utilisés dans l'industrie, par exemple sur le bois et la pâte à papier ou les strates de sable poreuses dans l'industrie de l'extraction du pétrole.
TP13	Produits de protection des fluides de travail ou de coupe	Produits pour lutter contre les altérations microbiennes des fluides utilisés pour le travail ou la coupe du métal, du verre ou d'autres matériaux.
Numéro	Type de produits	Description
Groupe 4: Autres produits biocides		
TP22	Fluides utilisés pour l'embaumement et la taxidermie	Utilisés pour désinfecter et préserver la totalité ou certaines parties de cadavres humains ou animaux.

11 Annexe 2 : suivi des actualisations du rapport

Date	Page	Description de la modification
02 avril 2020	1	Remplacement du titre de l'autosaisine « Saisine relative à l'évaluation de la résistance des biocides antimicrobiens » par « Saisine relative à l'évaluation de la résistance aux biocides antimicrobiens »
02 avril 2020	11	Remplacement « de l'élevage » par « et vétérinaire »
02 avril 2020	11	Remplacement de « En cohérence avec ce constat, le Règlement biocide stipule que dans le considérant 37 puis dans l'article 19 [(1.b) ii] que « lors de l'autorisation d'un produit biocide, il est nécessaire de s'assurer de l'absence d'effet inacceptable sur les organismes cibles en particulier une résistance ou et une résistance croisée inacceptable vis-à-vis des biocides ou et des antibiotiques » par « En cohérence avec ce constat, le Règlement biocide stipule respectivement dans le considérant 37 puis dans l'article 19 [(1.b) ii] que: « Lors de l'autorisation d'un produit biocide, il est nécessaire de s'assurer que ce produit, lorsqu'il est correctement utilisé pour l'usage auquel il est destiné, est suffisamment efficace et n'induit pas d'effet inacceptable tel qu'une résistance chez les organismes cibles ni de souffrance ou de douleur inutile dans le cas des vertébrés ». « Le produit biocide n'a aucun effet inacceptable sur les organismes cibles, en particulier une résistance ou une résistance croisée inacceptable, ou des souffrances et des douleurs inutiles chez les vertébrés »
02 avril 2020	14	Suppression de « Utiliser des CMI ou CMB puis établir des relations avec l'usage des produits » de la définition de la résistance selon la référence Gilbert et McBain 2003
02 avril 2020	14	Suppression de « Tolérance employée lors d'une résistance intermédiaire » (Sheldon 2005)
02 avril 2020	37	Remplacement de « ADNr » par « ARNr »
02 avril 2020	38	Remplacement de « quaternaire » par « tertiaire »
02 avril 2020	46	Remplacement de « Le temps de contact sera unique. La durée de contact pourra être de plusieurs jours à plusieurs mois pour couvrir une durée jusqu'à ouverture » par « Le temps de contact sera unique. La durée de contact pourra être de plusieurs jours à plusieurs mois pour couvrir une durée jusqu'à l'ouverture du produit. »
02 avril 2020	55	Remplacement de « Myzaky » par « Myzaki »

12 Annexe 3 : Décision de l'auto-saisine



2016 -SA- 0 2 3 8

Décision N° 2016-11-372

AUTOSAISINE

Le directeur général de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses),

Vu le code de la santé publique, et notamment son article L. 1313-3 conférant à l'Anses la prérogative de se saisir de toute question en vue de l'accomplissement de ses missions,

Décide :

Article 1^{er}.- L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail se saisit afin de réaliser une expertise dont les caractéristiques sont listées ci-dessous.

1.1 Thématiques et objectifs de l'expertise

Les objectifs de cette expertise sont en rapport avec la problématique de la résistance aux biocides antimicrobiens. Plus précisément, il s'agit de concourir à améliorer la prise en compte de cette problématique dans le cadre de l'évaluation réglementaire a priori des produits biocides antimicrobiens. Dans ce but, l'expertise comprendra deux volets : (1) le développement d'une méthode dans le but d'évaluer le risque potentiel d'apparition de résistance ou / et de résistance croisée de bactéries suite à l'application de produits biocides à activité antibactérienne – (2) la proposition d'une stratégie de gestion de la résistance.

1.2 Contexte de l'autosaisine

Le règlement européen n°528/2012 du 22 mai 2012, en application depuis le 1^{er} septembre 2013, régit la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides, visant à améliorer la libre circulation des produits biocides dans l'Union Européenne tout en garantissant un niveau élevé de protection de la santé humaine et animale et de l'environnement. Ce règlement stipule dans le considérant (37) puis dans l'article 19 [1.b) ii] que lors de l'autorisation d'un produit biocide, il est nécessaire de s'assurer que celui-ci n'induit pas d'effet inacceptable sur les organismes cibles en particulier une résistance ou une résistance croisée inacceptable. De plus, l'article 23 (b), traitant de l'évaluation comparative des produits biocides contenant une substance active dont la substitution est envisagée, insiste sur le critère de la diversité chimique pour réduire autant que possible le risque de développement de résistance. De même, l'article 47 (b) oblige la notification, par le titulaire d'une autorisation de mise sur le marché, de données indiquant qu'une substance active est susceptible d'induire le développement de résistance. Enfin, ces points sont rappelés dans les annexes II et III concernant les exigences en matière d'informations à fournir sur les substances actives et les produits biocides ainsi que dans l'annexe VI du même règlement relative aux principes communs d'évaluation des dossiers de produits biocides.

En appui de cette réglementation un document guide européen (Technical notes of Guidance on product evaluation), dans son chapitre 6 (point 6.2), développe en premier lieu un sous-chapitre 6.2.1 sur les définitions (résistance, résistance croisée, tolérance) puis (6.2.2) précise que les données sur l'apparition de résistance peuvent venir d'études au laboratoire et d'études réalisées sur le terrain. Enfin, un sous-chapitre 6.2.3 traite de l'évaluation en décrivant les grands principes à mettre en œuvre afin d'apprécier le risque d'un tel développement de résistance, la possibilité de résistance croisée et la stratégie de gestion de cette résistance. Dans ce chapitre, il est essentiellement fait référence aux développements de résistance à l'application des insecticides et rodenticides, mais aucunement aux biocides antimicrobiens. Dans tous les cas il n'est pas décrit de conduite à tenir afin d'évaluer ce risque.

Au jour d'aujourd'hui, ces différents textes ne s'appuient sur aucun référentiel ou approche méthodologique qui permettrait au niveau européen d'appréhender ce risque de résistance de manière harmonisée. Notons que parmi les 22 types de produits couverts par le règlement biocides essentiellement 13 d'entre eux peuvent être concernés par une telle démarche d'évaluation des risques de résistance ou, et de résistance croisée à l'usage des biocides antimicrobiens (TP 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 22).

Enfin, à ce contexte propre à la réglementation sur les biocides il apparaît aussi essentiel de mentionner une note de la Commission Européenne de novembre 2015 (CA-Nov15-Doc.7.6) invitant au développement de discussions avec les autorités compétentes en charge des produits biocides afin d'inclure le risque de développement de résistance aux antibiotiques suite à l'usage de biocides antimicrobiens.

1.3 Questions sur lesquelles portent les travaux d'expertise à mener

Ce contexte met en avant toute une série de questions qu'il est nécessaire d'appréhender.

En tout premier lieu, ce qui caractérise cette réglementation c'est le très grand nombre d'usages associés à une grande diversité de modes et conditions d'applications qu'il faudra lister à partir des matrices d'usages des guides efficacité européens déjà existantes pour une majorité des TP ciblés (TP 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 22). A partir de cette liste, il faudra établir une priorisation qui pourrait retenir comme critère l'importance que pourrait avoir, pour la santé humaine et la santé animale, le développement d'une résistance en lien avec ces usages.

Cette analyse devra aussi tenir compte de la diversité des substances actives que l'on peut retrouver assez souvent sous forme de mélanges. Par ailleurs, les mêmes substances actives peuvent être formulées pour un large éventail d'usages avec toutefois des concentrations et doses d'emploi sensiblement différentes. D'autre part, à cette diversité d'usages correspond une large diversité de cibles bactériennes d'intérêt qui peuvent avoir des capacités d'adaptation très différentes. Cette capacité d'adaptation va modifier les profils de sensibilité aux molécules biocides mais aussi à d'autres antimicrobiens que sont les antibiotiques, et il se posera dans le même temps dans l'un et l'autre cas la question de la stabilité de cette adaptation.

Pour la mise en évidence de ces phénomènes d'adaptation ou de résistance aux biocides antimicrobiens, liés ou pas au développement d'antibiorésistance, de nombreux travaux scientifiques ont été publiés qu'il faudra dans un premier temps recenser tout en évaluant leur pertinence au regard de l'évolution des connaissances scientifiques. Partant de ces données, il faudra les croiser à la fois avec la diversité des usages et des conditions d'application. Ainsi une série de paramètres devront être identifiées comme la recherche d'une bactéricidie ou d'une bactériostase, les niveaux attendus de performance, la fréquence d'application, la présence ou non de matières organiques interférentes, la présence de biofilm, la durée des expositions, la nature du ou des milieux traités,...

Au final, divers choix méthodologiques seront retenus en cohérence avec les usages et conditions d'application des biocides antimicrobiens, choix qui seront intégrés dans un arbre décisionnel

permettant *in fine* d'apprécier le risque induit, à savoir un défaut de performance ou / et le développement de résistances croisées à d'autres biocides antimicrobiens voire antibiotiques.

Ce travail sera complété par une réflexion sur la stratégie de gestion de ce risque de développement de résistance des bactéries aux biocides antimicrobiens.

Une fois ce référentiel produit et validé au niveau français, il sera proposé pour discussions et approbation au niveau européen dans le cadre des missions menées par le groupe de travail Efficacité de l'ECHA.

1.4 Durée prévisionnelle de l'expertise

L'expertise sera réalisée sur une durée de 24 mois à compter de la mise en place du groupe de travail au sein du CES substances actives et produits biocides.

Article 2.- Un avis sera émis et publié par l'Agence à l'issue des travaux.

Fait à Maisons-Alfort, le

09 NOV. 2016

Pour le directeur général
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de
l'alimentation, de l'environnement et du travail
Et par délégation
Directeur général adjoint scientifique

Gérard LASFARGUES

Dr Roger GENET
Directeur général



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
F94701 Maisons-Alfort cedex
www.anses.fr
 @Anses_fr