

Maisons-Alfort, le 16 février 2016

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

relatif à une « Demande d'avis sur le risque de développement de résistances aux antibiotiques chez les bactéries suite à l'utilisation d'acides organiques ou de formaldéhyde en tant que décontaminant des aliments pour animaux »

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 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 rendus publics.

L'Anses a été saisie le 28 avril 2015 par la DGCCRF pour la réalisation de l'expertise suivante : demande d'avis relatif au risque de développement de résistances aux antibiotiques chez les bactéries suite à l'utilisation d'acides organiques ou de formaldéhyde en tant que décontaminant des aliments pour animaux.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La Commission européenne avait indiqué fin 2013 qu'elle envisageait de proposer la création d'un nouveau groupe fonctionnel d'additifs permettant la décontamination des aliments pour animaux. Dans ce cadre, la DGCCRF a été amenée à saisir l'Anses sur l'impact que pourrait entraîner ce nouveau groupe fonctionnel pour la santé animale, la santé humaine et l'environnement (saisine n°2014-SA-0030). La saisine précisait que plusieurs produits étaient envisagés pour répondre à cette fonction, notamment le formaldéhyde, les huiles essentielles et les acides organiques.

L'Anses a rendu son avis le 26 septembre 2014 (Anses, 2014). Cet avis concluait que : « *il n'existe donc pas de phénomène de résistance aux acides qui soit acquise et transmissible pour les entérobactéries* » et « *Cet ensemble de données suggère qu'il existe peu de résistance au formaldéhyde* ». Néanmoins, l'avis de l'Anses n'évalue pas pleinement la possibilité de développement d'une antibiorésistance due à ce traitement par le biais d'acides organiques ou de formaldéhyde, qui a été considérée hors champ de la saisine compte tenu des délais impartis. Or, comme indiqué dans l'avis de l'Anses, le *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR)* de la DG SANCO a publié en 2009 une évaluation sur les effets des biocides sur le développement de l'antibiorésistance. Ce rapport cite plusieurs mécanismes communs de résistance aux biocides et aux antibiotiques. Il identifie l'utilisation

large et répandue d'un biocide (comme ce pourrait être le cas lors d'autorisation de produits pouvant décontaminer les aliments pour animaux) comme un facteur de risque pour le développement de l'antibiorésistance. Ce développement d'antibiorésistance a été démontré en laboratoire pour certains biocides, notamment le formaldéhyde, bien que le rapport précise qu'il n'existe pas à ce stade d'études de terrain démontrant de manière fiable ce risque.

Lors d'un groupe de travail en septembre 2014, la Commission européenne avait confirmé son intention de procéder à la création d'un groupe fonctionnel qui permettrait la décontamination des aliments pour animaux. La définition proposée par la Commission pour ce nouveau groupe était la suivante : « *substances pour l'amélioration des conditions hygiéniques des aliments pour animaux : substances, ou, le cas échéant, micro-organismes qui empêche la contamination microbienne spécifique des aliments pour animaux* » (« *substances for the improvement of hygienic condition of feed : substances, or when applicable, micro-organisms which prevents the specific microbial contamination of feed* »).

Finalement, le Règlement (UE) 2015/2294 de la Commission du 9 décembre 2015 a créé ce nouveau groupe fonctionnel dont l'intitulé est défini ainsi :

« Améliorateurs des conditions d'hygiène : substances ou, le cas échéant, micro-organismes qui ont un effet positif sur les caractéristiques hygiéniques des aliments pour animaux en réduisant une contamination microbiologique spécifique ».

A l'heure actuelle, aucun produit ne figure dans ce groupe fonctionnel.

Compte tenu des éléments exposés ci-dessus, l'avis de l'Anses est demandé sur les questions suivantes :

1. L'autorisation d'acides organiques comme substances permettant de décontaminer les aliments pour animaux, y compris dans une utilisation de manière préventive, pourrait-elle entraîner le développement de résistances aux antibiotiques chez les bactéries ?

2. L'autorisation du formaldéhyde comme substance permettant de décontaminer les aliments pour animaux, y compris dans une utilisation de manière préventive, pourrait-elle entraîner le développement de résistances aux antibiotiques chez les bactéries ?

Cet avis permettra d'enrichir la réflexion de la DGCCRF sur la position française relative au nouveau groupe fonctionnel d'additif, et sera transmis le cas échéant à la Commission européenne.

1.1. Limite du champ de l'expertise

La question telle qu'indiquée dans la dénomination du groupe fonctionnel d'additif « décontamination des aliments pour animaux » était très large : elle a été restreinte dans l'examen de la saisine à la décontamination des aliments en entérobactéries.

L'expertise s'est focalisée sur les produits cités dans la saisine (le formaldéhyde, les acides organiques) ainsi que sur les cibles de ces produits : les entérobactéries dans l'aliment.

En effet, les experts soulignent que les connaissances scientifiques disponibles ne permettent pas d'étendre l'expertise à l'évaluation de l'effet de ces produits sur la résistance aux antibiotiques des bactéries du microbiote intestinal.

Le champ de l'expertise sera donc limité à l'effet sur la résistance aux antibiotiques des entérobactéries dans l'aliment.

Le terme préventif, utilisé dans les questions 1 et 2, a été considéré par les experts dans le sens d'une utilisation devenant systématique.

1.2. Définition du terme « décontaminant » et conséquence sur le champ de l'expertise.

La définition du groupe fonctionnel signifie que les experts peuvent envisager les conséquences des effets bactéricides sur les micro-organismes, sans critère précis et préétabli de taux de réduction.

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 au comité d'experts spécialisé « Alimentation animale » (CES ALAN) l'instruction de cette saisine.

Elle s'est appuyée sur le rapport de quatre rapporteurs, un rapporteur du CES ALAN et trois rapporteurs extérieurs, sollicités pour leurs compétences en microbiologie, en biocides et en antibiorésistance.

A partir du rapport des experts, l'analyse et les conclusions du CES ont été validées lors des réunions des 15 décembre 2015 et 19 janvier 2016.

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 rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

3.1. Relation biocides et antibiorésistance

Les biocides et les antibiotiques présentent des similitudes en termes de résistances bactériennes en dépit de différences dans leur mode d'action. Globalement, les bactéries exposées à ces deux catégories de produits antimicrobiens peuvent mettre en place une batterie de mécanismes de défense indépendamment de leurs cibles d'action (Russell, 2002). Ces mécanismes de défense sont :

- ✓ soit innés, stables et présents le plus souvent chez toutes les souches d'un genre ou d'une espèce bactérienne (la résistance est dite intrinsèque ou naturelle) ; ils sont transférables à la descendance car portés par le chromosome (transmission verticale) et peuvent conférer une résistance élevée vis-à-vis des produits antimicrobiens (biocides et antibiotiques) ;
- ✓ soit acquis par différents mécanismes (la résistance est dite acquise) comme les mutations chromosomiques ou acquisition d'ADN extra-chromosomique mobile ; ils sont transférables d'une bactérie à une autre et/ou à la descendance.

La première ligne de défense face à des attaques de substances chimiques extérieures est la stimulation de régulateurs bactériens déclenchant un effet barrière de la membrane. Deux mécanismes sont décrits afin de contrôler la concentration intracellulaire en antimicrobiens :

- ✓ la diminution de l'influx, en réduisant l'expression de porines actives présentes au niveau de la membrane externe ou en modifiant la structure des lipo-polysaccharides, des

protéines ou des lipides (Guerin-Mechin *et al.*, 1999) constituant la paroi bactérienne (Tattawasart *et al.*, 1999) ;

- ✓ l'expression ou la surexpression des pompes à efflux expulsant les substances toxiques des bactéries. Ce dernier mécanisme est le plus souvent décrit. Ces pompes à efflux peuvent être spécifiques d'une ou plusieurs substances chimiques (produits antimicrobiens, colorants, métaux) comme les pompes appelées MDR pour MultiDrugResistance pumps (Hansen *et al.*, 2007).

Il semble que plusieurs mécanismes de défense puissent être le plus souvent mis en œuvre par une bactérie pour se défendre face à un stress chimique pouvant être représenté par le biocide (Bailey *et al.*, 2009). Ainsi, nous pouvons citer l'exemple de *Salmonella* spp. et la mise en évidence de variants résistants stables qui sont sélectionnés par deux types de biocides et qui présentent un déficit en porines et une augmentation de l'efflux. Ces variants se sont révélés moins sensibles à des antibiotiques comme la ciprofloxacine, le chloramphénicol, la tétracycline et l'ampicilline en comparaison avec la souche sauvage (Randall, 2007; SCENIHR, 2009).

En addition à ces phénomènes, d'autres mécanismes peuvent intervenir comme les mutations spontanées au niveau de l'ADN et l'acquisition d'éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons). Ces éléments génétiques mobiles codent pour des transporteurs membranaires qui vont véhiculer une molécule unique ou, le plus souvent, différentes molécules de structure chimique variée. Ils sont transférés d'une bactérie à une autre par l'un des 3 mécanismes suivants : la conjugaison (plasmides conjugatifs), la transformation (ADN nu) et la transduction (phages). Ces transferts horizontaux sont généralement plus fréquents que les phénomènes de mutations. Plus rarement, ces éléments génétiques peuvent également coder pour des facteurs de résistance comme des enzymes qui vont modifier ou inactiver le biocide. A l'exception des mutations, les autres mécanismes (efflux, modification de perméabilité, modification enzymatique) peuvent être impliqués à la fois dans la résistance naturelle et/ou acquise.

L'exposition aux biocides peut également conduire à des adaptations des bactéries à des changements environnementaux se traduisant par des modifications de leur phénotype leur permettant de survivre (modification du taux de croissance, colonies de petite taille, diminution de leur pouvoir d'invasion). Cet état d'adaptation physiologique est transitoire et disparaît en l'absence de contact avec le biocide.

Les quelques mécanismes qui jouent un rôle important dans la résistance sont contrôlés par des régulations en cascade de gènes qui partagent des régulateurs communs (SoxS, MarA) (Grkovic *et al.*, 2002; Randall *et al.*, 2004). Ainsi, chez *Escherichia coli* et *Salmonella* spp., ces régulateurs sont impliqués dans l'induction de gènes de résistance multi-molécules (biocides, oxydants et antibiotiques).

3.2. Description des produits concernés par la saisine

3.2.1. Acides organiques

Les acides organiques représentent une famille hétérogène sur le plan de la structure chimique, se différenciant par le nombre de carbones, le nombre de groupements carboxyliques, la présence ou non d'un ou plusieurs groupes hydroxyle, et la présence ou non de double liaison. Cette diversité leur confère des valeurs de pKa qui peuvent varier de 1,3 à 6,4, les acides mono-, di- et tricarboxylique ayant respectivement une, deux ou trois valeurs de pKa. Ces valeurs jouent un rôle important dans la dissociation des acides organiques et donc sur l'activité antibactérienne de ces composés puisque ces molécules sont davantage actives sous leur forme non dissociée.

Certaines de ces molécules sont plus communément citées pour leur utilisation dans les industries de la viande et des volailles comme les acides acétique, citrique, lactique, propionique, malique, succinique et tartrique (Alvarez-ordonez A., 2012; Davidson M., 2002; Mani-Lopez, 2012). A partir de ces exemples, nous faisons le constat que sur le plan de leur structure chimique nous

retrouvons des acides mono-, di- et tricarboxylique, avec présence d'une ou deux fonctions hydroxyle et des chaînes carbonées allant de deux à six carbones.

En l'absence d'étude portant sur l'effet de traitements acides sur des aliments pour animaux et leurs conséquences sur l'antibiorésistance portée par les bactéries dans l'aliment, l'évaluation de ce risque sera proposée à partir des usages de ces produits en industries agro-alimentaires, en aval de la production primaire.

Les acides sont en effet parfois utilisés en usine d'abattage/découpe des animaux de rente (volailles, porcs et bovins). Les acides propionique, lactique, acétique auxquels a été associé l'acide peracétique, sont parmi ceux qui ont fait l'objet de la majorité des investigations quant à leur efficacité à éliminer/diminuer des populations bactériennes cibles sur les surfaces des carcasses (pour limiter l'altération ou la présence de pathogènes) et ce, depuis plusieurs décennies (Smulders et Greer, 1998).

Les acides sont utilisés dans l'eau des bacs de réfrigération des carcasses de volaille ou comme décontaminants des carcasses des animaux de plus grande taille (porc et bœuf) dans l'eau du dernier rinçage de la carcasse ou par aspersion. Les concentrations utilisées (souvent jusqu'à 2%) et la durée des traitements peuvent engendrer un stress acide aigü pour les bactéries et entraîner la mise en place d'une réponse à large spectre de celles-ci (Zhao et Houry, 2010). L'efficacité de ces traitements pour diminuer la charge bactérienne est souvent confirmée, sous réserve de la dose, de la durée d'application et des conditions de température du traitement. L'efficacité de la décontamination varie selon l'inoculum initial, mais même avec les traitements présentant l'efficacité la plus faible, une diminution de l'ordre de 1Log UFC de la population cible (par exemple de flore aérobie mésophile, de *E coli* ou de certains pathogènes comme *Campylobacter*) ou une réduction de prévalence pour les pathogènes comme *Salmonella*, peut être aisément envisagée (Bucher *et al.*, 2012). On privilégiera dans la prise en compte de ces études des analyses sur des carcasses naturellement contaminées et traitées dans des conditions mimant de façon réaliste des conditions industrielles. A titre d'exemple, le « trempage » en laboratoire est plus ou moins pertinent car il ne reproduit pas les intenses interactions entre les surfaces dans un refroidisseur rotatif industriel. L'analyse microbiologique peut présenter des difficultés importantes lorsqu'elle cible l'évaluation quantitative de bactéries stressées. Quelques auteurs considèrent que les plus faibles dénombrements observés lors des traitements par les acides sont davantage la conséquence d'un effet masquant (par une perte transitoire de cultivabilité) que le résultat d'une réelle bactéricidie (Zhang *et al.*, 2011). La principale limite à l'utilisation industrielle des acides dans la transformation de viande est l'apparition de changements organoleptiques indésirables lors de l'application de ces produits (Bilgili *et al.*, 1998) ce qui explique que les concentrations utilisées sont forcément limitées.

3.2.2. Formaldéhyde.

L'avis de l'Anses du 26 septembre 2014 (saisine 2014-SA-0030) reprend le mode d'action du formaldéhyde vis-à-vis de *Salmonella* ainsi que les concentrations efficaces. Ainsi, l'avis conclut qu'aux doses comprises entre 200 et 1000 mg/kg le formaldéhyde (associé à du méthanol pour prévenir le risque de polymérisation) présente une efficacité certaine pour la décontamination des aliments pour animaux vis-à-vis des salmonelles.

3.3. Analyse de la bibliographie

Les objectifs de cette analyse bibliographique visant certains acides organiques et le formaldéhyde sont l'évaluation de la pertinence des données scientifiques afin de pouvoir affirmer ou non que les

traitements des aliments pour animaux sont susceptibles de faire émerger ou d'amplifier l'antibiorésistance d'espèces bactériennes d'intérêt.

3.3.1. Les acides organiques et l'antibiorésistance

3.3.1.1. Analyse globale de la bibliographie

Les travaux et articles de synthèse sur le thème de l'adaptation aux stress acides des espèces bactériennes sont très nombreux. Nous pouvons citer trois articles relativement récents qui font le point plus spécifiquement sur *Salmonella* spp. démontrant l'intérêt des acides organiques contre ce danger et développant les mécanismes moléculaires responsables de cette résistance. Dans ces travaux sont citées 7 molécules souvent employées en industries des viandes et volailles : acides acétique, citrique, lactique, propionique, malique, succinique, tartrique (Alvarez-ordonez A., 2012; Davidson M., 2002; Mani-Lopez, 2012). L'évaluation de la sensibilité intrinsèque des bactéries à cette série de molécules actives démontre globalement un niveau de résistance naturelle supérieur pour les bactéries à Gram positif et, parmi les bactéries à Gram négatif, celles du genre *Pseudomonas* apparaissent beaucoup plus sensibles en comparaison d'espèces comme *Salmonella* spp. et *Escherichia coli* (Martin, 2012).

Dans la bibliographie, peu d'articles concernent l'utilisation d'acides organiques comme décontaminant et leur effet sur la résistance bactérienne aux antibiotiques. Les articles référencés sur cette thématique seront analysés dans le chapitre 3.3.1.2. Ils ne concernent jamais l'aliment des animaux :

- Capita *et al.*, (2013) ;
- Capita *et al.*, (2007) ;
- Potenski *et al.*, (2003) ;
- Alonso-Hernando *et al.*, (2009) ;
- Rajkovic *et al.*, (2009).

3.3.1.2. Analyse critique des articles bibliographiques d'intérêt :

❖ Analyse de l'article de Capita *et al.* (2013) :

Au-delà de l'efficacité de la décontamination montrée sur un nombre souvent limité d'indicateurs microbiens, l'effet des traitements de carcasse sur une modification plus globale de la composition de la flore est peu documenté. Capita *et al.*, après quelques études de l'effet bactéricide de solutions décontaminantes dont les acides ascorbique et citrique, ont pris l'option de regarder l'évolution de la sensibilité aux antibiotiques de populations d'*E. coli* (Capita *et al.*, 2013). Dans les conditions de cette étude, il ressort sans ambiguïté qu'après 5 jours de stockage des pièces de découpe de volaille traitées, si la population bactérienne présente le même niveau que sur les pièces non traitées, un phénomène de moindre sensibilité à certains antibiotiques de l'antibiogramme apparaît. Les proportions de *E. coli* résistant à l'amoxicilline-acide clavulanique, au triméthoprim-sulphaméthoxazole et à la ciprofloxacine sont augmentées, 5 jours après un traitement de 15 minutes dans une solution d'acide ascorbique (2%) ou d'acide citrique (2%), avec pour ce dernier une plus grande résistance également à la tétracycline. Plusieurs remarques peuvent être formulées :

- 1) Cette étude a été réalisée sur un nombre de lots non précisé de pièces de poulet. Un seul lot aurait augmenté l'homogénéité, on peut penser que les 50 cuisses viennent du même lot mais ce n'est pas précisé ;
- 2) Les résultats de cette étude n'ont pas fait l'objet d'une répétition biologique. L'ensemble des analyses présentées correspond à un nombre d'échantillons limité. Il s'agit au mieux de résultats issus de 10 pièces par traitement, mais il n'est pas clairement précisé s'il a été

possible de prélever deux fois sur une même cuisse (à J0 et à J5) les 5 g de peau constituant un échantillon. La distribution des 250 isolats repiqués (125 à chaque date, et 25 par groupes d'échantillon selon les auteurs) et le repiquage de 3 à 6 isolats par boîte d'isolement plaident pour un échantillonnage destructif de chaque cuisse. En conséquence, il est raisonnable de penser qu'il s'agit de résultats issus de 5 pièces par traitement et par date ;

- 3) Les conclusions sont portées sur l'analyse de 25 isolats par condition et par date, leur représentativité par échantillon n'est pas clairement précisée.

Par ailleurs, à l'analyse détaillée des résultats, il apparaît qu'au cours de la conservation des cuisses de volaille ensachées, il y a une multiplication importante de la population d'*E. coli* (croissance d'environ 2,5 Log UFC/g de peau). Cette croissance intervient particulièrement sur les pièces préalablement traitées par les acides, ces dernières montrent après 5 jours des concentrations équivalentes à celle des témoins en *E. coli* (de l'ordre de 4,3 LogUFC/g de peau). Les fortes concentrations initiales et la multiplication des *E. coli* observées au cours du temps indiquent que dans cette étude pendant le stockage :

- ✓ les conditions de préparation des pièces n'ont pas été optimales : la charge en *E. coli* est supérieure à 3 Log UFC/g, très supérieure à ce que l'on attend selon les standards de production industrielle de volaille au moment de l'étude (Zhang *et al.*, 2011) ;
- ✓ et que la conservation ne s'est pas déroulée dans les conditions classiques.

En effet la conservation favorise en condition aérobie la multiplication des *Pseudomonas*, flore d'altération classique des viandes de volailles. Les bactéries de ce genre deviennent rapidement la flore majoritaire (Bowers *et al.*, 2008), et le groupe de Capita l'avait vérifié en 2012 (Alonso-Hernando *et al.*, 2012). Ces résultats indiquent que des conditions de conservation particulières des pièces dans cette investigation de 2013 ont orienté la flore de surface de ces cuisses de volaille de façon non conventionnelle, sans doute par une absence d'oxygénation dans les sacs de stockage des pièces. Aussi, avant de généraliser les résultats de cette étude, une reproduction biologique dans des conditions standards de production et de conservation est nécessaire.

De plus, une meilleure caractérisation de la flore de surface en général, ainsi qu'une caractérisation des *E. coli* en particulier, sont nécessaires pour répondre aux questions suivantes :

- 1) Les *E. coli* à J0, avant traitement, sont-ils les mêmes sur les cuisses traitées et sur les témoins ?
- 2) Les *E. coli* isolés à 5 jours sur les cuisses de volaille, et qui présentent une résistance plus élevée aux antimicrobiens, sont-ils nouveaux (ont été sélectionnés par le traitement) ou s'agit-il des clones majoritaires, déjà présents à J0, et qui ont acquis le phénotype ?

La réponse à ces questions permettrait de comprendre si le traitement à l'acide citrique à 2% ou l'acide ascorbique à 2% a conduit à une sélection de souches plus antibiorésistantes ou si le traitement a induit un phénomène de mutation.

L'analyse d'une évolution de l'antibiorésistance consécutive à un traitement décontaminant des carcasses est rarement faite. Au contraire, la littérature décrit des études de l'émergence d'une antibiorésistance dans un contexte beaucoup plus large : des comparaisons de différents types de production autorisant ou non l'usage l'antibiotique (Fraqueza *et al.*, 2014).

Ainsi, les travaux de Capita *et al.* (2013) sont originaux car ils sont réalisés sur une denrée d'origine animale, mais cette étude mériterait d'être répétée, dans des conditions de conservation plus proches de celles observées dans l'industrie.

❖ Analyse de l'article de Capita (2007) :

L'article se propose de considérer trois traitements biocides. Il s'agit du chlorite de sodium acidifié (ASC), du phosphate tri-sodique (TSP) et de l'acide citrique (AC), ce dernier illustrant les acides organiques. La sensibilité à ces traitements de différentes *Salmonella* est évaluée en milieu liquide et analysée selon le sérotype, le phage type, et le niveau de résistance aux antibiotiques (nombre de résistances) porté par les souches. Sachant que ces biocides sont utilisés et efficaces en industrie, l'association que se propose de décrire l'étude justifierait sa prise en compte dans le choix des souches de *Salmonella* pour les futurs tests d'efficacité de décontaminants.

Pour instruire cette question, des analyses *in vitro* sont réalisées sur une collection définie de souches de *Salmonella enterica*, chacune des souches est soumise à une concentration élevée des trois décontaminants. A ce sujet, sauf erreur de typographie, l'utilisation de l'acide citrique est conduite à 25%, soit 10 fois la dose applicable sur carcasse (dose rappelée par l'auteur dans l'introduction).

L'analyse consiste à établir puis à comparer des cinétiques de perte de cultivabilité dues aux trois biocides à l'étude. Dans les conditions testées, les diminutions observées apparaissent sur une échelle de temps ayant la seconde comme unité. Le mode opératoire utilise une inactivation du décontaminant par l'ajout de thiosulfate de sodium avant une mise en culture sur gélose. Dans ce contexte, il est capital d'exprimer la variabilité expérimentale attendue importante. Or, les graphiques proposés ne présentent pas de variabilité autour des moyennes expérimentales, malgré les 3 répétitions biologiques annoncées par l'auteur. Les droites qui sont construites autour de ces points tolèrent des écarts aux moyennes jusqu'à 0,6 Log (N/N0).

Les 60 souches utilisées sont 36 souches de *Salmonella* Enteritidis et 24 souches représentant 8 autres sérotypes. Par ailleurs, l'auteur distribue, à l'intérieur de chaque sérotype, les souches selon leur phage type (pour Enteritidis) et leur degré d'antibiorésistance, compris entre 0 et 9. Pour ce dernier tri, finalement, les souches sont classées et regroupées comme sensibles à tous les antibiotiques, résistantes à un antibiotique ou multirésistantes (plus d'un antibiotique). Malgré cette volonté de regroupement, chaque catégorie de souches est représentée par un très faible nombre d'isolats et les résultats devraient être analysés avec cette limite en tête. A titre d'exemple, le résultat significatif pour un lien entre l'effet de l'ASC et la résistance antibiotique est présenté comme une propriété de sérotype alors que les comparaisons se font respectivement sur 3, 2 et 1 isolats : rien ne permet de privilégier une variabilité de sérotype plutôt qu'une variabilité de souche. Les analyses par phage type au sein de *Salmonella* Enteritidis sont également très discutables : la différence annoncée entre des souches de PT1 versus PT4b est certes statistiquement significative, mais les valeurs sont très proches (k respectivement de 5,75 et de 5,99 en secondes), et surtout ces moyennes concernent des données obtenues, sans répétition technique, respectivement pour 4 et 2 isolats.

A la suite de cette étude, ni le sérotype, ni le phage type ou le nombre de résistances aux antibiotiques n'est associé à une moindre sensibilité à un traitement par un acide organique (ici AC). Cependant les concentrations utilisées (25%) sont telles que si une différence existait entre ces souches, elle pourrait ne pas être mise en évidence. Dans les conditions de ce traitement, la diminution logarithmique intervient en 12,2 secondes. L'usage d'une telle concentration d'acide, indiquée dans le matériel et méthode paraît surprenant quand l'auteur souligne une utilisation en industrie à 2,5% maximum. Aucune explication n'est fournie par l'auteur. En conclusion, si les résultats de cette étude confirment *in vitro* une variabilité biologiquement significative entre les souches de *Salmonella* quant à leur résistance à un traitement ASC et dans une moindre mesure au TSP, les liens affirmés par l'auteur avec le sérotype, le phage type et l'antibiorésistance ne sont pas confirmés par des résultats convaincants. Par ailleurs, cette étude réalisée en bouillon au laboratoire est difficilement transposable à ce qui se passe en abattoir lors de décontamination de carcasse. Cette différence est reconnue par l'auteur tant dans la définition de son objectif que dans la conclusion de ses travaux.

Ainsi, cet article ne permet pas de soutenir l'hypothèse d'une plus grande résistance aux antibiotiques de la flore de carcasse de volaille ou des bactéries d'un aliment pour animaux, après un traitement par les acides organiques.

❖ **Analyse de l'article de Potenski et al. (2003)**

Dans cette étude, des mutants sont générés suite à l'exposition d'isolats de *Salmonella* Enteritidis à un produit chloré (25 ppm de chlore) classiquement utilisé dans le domaine agro-alimentaire et à des conservateurs utilisés dans l'alimentation humaine et animale : l'acide acétique (0,05%), le benzoate de sodium (1%) et le nitrite de sodium (1%) (Potenski et al., 2003).

Un des isolats est plus particulièrement étudié. Il est exposé indépendamment à chacun des conservateurs pendant 24h en milieu nutritif et une colonie pour chacun des traitements est sélectionnée de façon aléatoire et classifiée comme mutante.

Chacun des mutants montre une faible augmentation de la CMI à la tétracycline comparée à l'isolat sauvage, d'un facteur 2 à 4 selon la molécule considérée. Pour autant, aucun changement du phénotype, c'est-à-dire de sensible à résistant, n'est observé pour la tétracycline. Ce résultat souligne que cet usage à des concentrations faibles peut être responsable de la sélection de mutants de moindre sensibilité à des antibiotiques. Chaque mutant maintient un niveau de résistance à la tétracycline après 10 passages répétés en absence de conservateur, traduisant la stabilité de ce phénomène de résistance. L'hypothèse émise par les auteurs est que l'opéron *mar*, montré comme présent chez toutes les *Salmonella* (Kunonga et al., 2000) serait responsable de cette résistance. Cette hypothèse est vérifiée par des expériences de complémentation associant les mutants sélectionnés par les conservateurs et des constructions contenant le gène *marR*, codant pour une protéine de régulation du gène *mar*. En effet, la sensibilité à la tétracycline est totalement retrouvée ce qui suggère que la mutation du gène *marR* serait responsable de l'augmentation de résistance.

Ce travail propose un modèle expérimental *in vitro* d'évaluation de la capacité d'adaptation des bactéries exposées à un agent antimicrobien et des conséquences sur la résistance aux antibiotiques. Ce modèle de laboratoire intéressant reste cependant non représentatif des conditions de terrain. Les travaux présentés confirment l'effet de l'exposition de substances telles que l'acide acétique sur l'augmentation stable de la résistance à un antibiotique : la tétracycline. Il aurait été également intéressant de vérifier l'augmentation de la résistance à d'autres antibiotiques notamment le chloramphénicol et l'acide nalidixique suite au contact avec l'acide acétique ce qui aurait été un élément supplémentaire permettant de confirmer l'implication de l'opéron *mar*. Par ailleurs, il est difficile de savoir si ces données obtenues sur un seul mutant seraient identiques pour d'autres isolats et d'autres sérotypes puisque seul le sérotype Enteritidis a été étudié.

❖ **Analyse de l'article de Alonso-Hernando et al. (2009)**

Dans cette étude, quatre souches de deux espèces bactériennes (*Listeria monocytogenes* sérotype 1/2a et 4b – *Salmonella enterica* sérotypes Typhimurium et Enteritidis) sont exposées à des concentrations croissantes de cinq substances actives (phosphate trisodique, chlorite de sodium acidifié, acide citrique, dioxyde de chlore, acide peracétique) sur la base de leurs valeurs de concentrations minimales inhibitrices (CMI) (Alonso-Hernando et al., 2009). Dans ce protocole, le nombre de repiquages dans ces concentrations croissantes n'est pas précisé même si l'on sait que chaque essai s'arrête lorsqu'aucune croissance ne se produit au bout de 3 jours d'incubation après le dernier repiquage. A la fin de cette période de repiquages, des tests de sensibilité par la méthode des disques sont réalisés au moyen de 15 antibiotiques comparant les souches parentales avant traitements et les isolats après traitements.

Le protocole opératoire appliqué lors de cette étude fait partie des quelques méthodes de laboratoire tout à fait conventionnelles souvent retenues pour l'évaluation de la capacité des bactéries à s'adapter à un environnement hostile comme la présence d'une substance chimique en concentration sub-létale. Dans ces conditions de laboratoire, nous sommes très éloignés des conditions terrain visées par les décontaminants des aliments pour animaux. De plus, dans cette étude, les séries de concentrations d'essais de chacune de ces substances actives ne sont pas précisées sachant toutefois qu'elles se situent dans des zones de concentrations bactériostatiques et non bactéricides.

Concernant les deux souches de *Salmonella enterica*, les phénotypes de résistance évoluent essentiellement pour deux antibiotiques : la streptomycine pour laquelle le statut peut passer de sensible à résistant (par l'utilisation de chlorite de sodium acidifié à l'acide citrique, dioxyde de chlore et acide peracétique) ou de sensible à intermédiaire (phosphate trisodique, acide citrique) et la némomycine pour laquelle le statut peut passer d'intermédiaire à résistant (par l'utilisation de acide citrique, acide peracétique, chlorite de sodium acidifié, phosphate trisodique et dioxyde de chlore). Concernant les deux souches de *Listeria monocytogenes*, les phénotypes de résistance peuvent évoluer vers le statut de résistant pour trois antibiotiques : la céphalotine et le chloramphénicol (chlorite de sodium acidifié) et la streptomycine (dioxyde de chlore).

En conclusion de l'analyse de cet article, si la démarche méthodologique n'appelle pas de critiques de fond, même si des imprécisions existent sur les gammes de concentrations appliquées pour chacune des 5 substances actives et sur le nombre de repiquages, on retient que les bactéries tests se sont adaptées avec des conséquences sur l'évolution des profils de résistance concernant deux ou trois antibiotiques suivant les espèces bactériennes. Cependant, plusieurs observations sont nécessaires :

- Les essais dans les conditions de laboratoire ne représentent pas les conditions d'applications telles qu'elles sont prévues dans le contexte de cette saisine ;
- Le nombre de souches est insuffisant pour toute possibilité d'extrapolation à l'ensemble des souches de ces deux espèces *Salmonella enterica* et *Listeria monocytogenes* ;
- Les concentrations des substances actives biocides représentent davantage des concentrations bactériostatiques plutôt que bactéricides ;
- Alors que le nombre de repiquages n'est jamais précisé, il aurait été important de savoir à partir de combien de contacts cette adaptation commence à se produire. Cette réponse est importante dans le contexte d'utilisation des produits décontaminants, objets de cette saisine ;
- Si la méthode des disques permet de mettre en évidence un niveau de résistance de nature clinique, elle ne permet cependant pas d'apprécier plus finement une éventuelle augmentation de la CMI sans pour autant que ces souches atteignent le statut de souches résistantes ;
- L'évolution vers un phénotype de résistance est une notion relative qui dépend beaucoup du statut des souches dans leur état initial. En clair, plus les souches sont sensibles au départ, plus il y aura de possibilités de mettre en évidence l'apparition de souches résistantes ;
- Enfin, dans cette étude les populations bactériennes viables et non cultivables n'ont pas fait l'objet de recherche, en conséquence de quoi des résultats faussement négatifs auraient été susceptibles d'être mis en évidence.

❖ Analyse de l'article de Rajkovic et al. (2009)

Une autre approche permettant de tester une augmentation de résistance est celle de Rajkovic *et al.*, consistant à évaluer la diminution du taux de réduction des populations bactériennes après contact avec la substance décontaminante (Rajkovic *et al.*, 2009). Dans cette étude, 3 cocktails de 3 ou 4 souches de 3 espèces bactériennes (*Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7) subissent séparément 20 traitements quotidiens de 10 minutes à l'acide lactique aux concentrations respectives de 2,5%, 3% et 8%. Dans de telles conditions, une adaptation stable de *Listeria monocytogenes* révèle une diminution du taux d'inactivation de 1,5 log₁₀ entre le 1^{er} et le 20^{ème} traitement. L'hypothèse émise est que ce stress de nature chimique favoriserait l'hypermutableté de cette bactérie, générant ainsi une sous-population résistante ; il a été démontré, effectivement par Sundin et Weigand (Sundin et Weigand, 2007), qu'une telle hypermutableté du génome de nombreuses bactéries exposées à un environnement hostile pouvait générer des mutants résistants aux antibiotiques.

Avant de pouvoir extrapoler ces résultats, nous faisons le constat :

- que cette étude a été conduite non pas dans des aliments mais dans des milieux de culture adaptés aux espèces bactériennes retenues ;
- que le nombre de souches est très limité et de ce fait non représentatif de la diversité de ces trois espèces bactériennes ;
- que la diminution du taux d'inactivation est progressive entre le 1^{er} et le 20^{ème} traitement suggérant l'apparition rapide d'une sous-population résistante. La caractérisation de cette sous-population nécessiterait des analyses protéomiques et transcriptomiques pour une meilleure compréhension de ces mécanismes de résistance ;
- que la recherche des bactéries viables et non cultivables (VNC) n'a pas été réalisée ce qui aurait pu révéler de faux résultats négatifs.

Si ce travail montre sans ambiguïté une capacité d'adaptation stable de bactéries à cet acide organique particulier qu'est l'acide lactique, avec pour conséquence une diminution de son efficacité, des travaux complémentaires pour une meilleure représentativité des espèces bactériennes au sein d'aliments, sur des analyses plus approfondies sur le dénombrement des bactéries VNC et sur la recherche des mécanismes de résistances, ainsi que des travaux permettant de faire le lien avec la résistance aux antibiotiques s'avèrent indispensables avant de statuer sur ce risque.

3.3.2. Le Formaldéhyde et l'antibiorésistance

3.3.2.1. Analyse globale de la bibliographie

Depuis de nombreuses années, des travaux ont mis en évidence l'existence de mécanismes permettant la détoxification du formaldéhyde au sein de micro-organismes par sa réduction par une déshydrogénase. Cette enzyme est probablement portée par un plasmide et ce même mécanisme a été observé pour les produits libérant du formaldéhyde. Cela peut concerner par exemple des bactéries aussi bien du genre *Pseudomonas* que l'espèce *Escherichia coli* ou autres membres de la famille des entérobactéries (Ando *et al.*, 1979; Cloete, 2003; Heinzl, 1986; Kato *et al.*, 1982; Kummerle *et al.*, 1996; Ogushi *et al.*, 1984; Sondossi *et al.*, 1989; Sondossi *et al.*, 1986). Ce gène, porté par un élément génétique mobile, pose la question importante du potentiel de dissémination de ce mécanisme de résistance (Chapman, 2003).

De même que pour les acides organiques, peu d'articles dans la bibliographie concernent l'utilisation de formaldéhyde comme désinfectant et son effet sur la résistance bactérienne aux antibiotiques. Les articles référencés sur cette thématique ne concernent jamais l'aliment des animaux et seront analysés dans le chapitre 3.3.2.2 :

- Randall *et al.*, 2007 ;
- Karatzas *et al.*, 2008 ;
- Frenzel *et al.*, 2011;
- Svetlikova *et al.*, 2009.

3.3.2.2. Analyse critique des articles bibliographiques d'intérêt

❖ Analyse de l'article de Randall *et al.* (2007)

Plusieurs études montrent que la croissance de souches de *Salmonella* et d'*E coli* en présence de concentrations sub-inhibitrices de désinfectants utilisés en élevage peut contribuer à une faible augmentation du nombre d'isollements de souches multi-résistantes à des antibiotiques (Randall 2004, 2005) notamment β lactamines, chloramphénicol, fluoroquinolones et tétracyclines.

En particulier, dans l'étude de Randall un produit désinfectant à base d'aldéhyde est appliqué à une concentration 2 fois supérieure à celle de la CMI, sur des *Salmonella* Typhimurium DT 104 isolées du terrain et des mutants pour lesquels certains gènes codant pour des pompes à efflux sont inactivés (Randall *et al.*, 2007). Dans la majorité des cas, les mutants isolés après exposition au désinfectant ont un phénotype identique et présentent une augmentation de la CMI de la ciprofloxacine d'un facteur 4. C'est pourquoi, les auteurs ont par la suite limité leur étude à un seul mutant représentatif de l'exposition au désinfectant à base d'aldéhyde. Ce mutant n'est pas déterminé comme multi-résistant aux antibiotiques puisqu'il est résistant à moins de 2 antibiotiques. Ce résultat signifie, dans le cas présent, qu'une exposition unique est insuffisante pour sélectionner un tel mutant. Ce dernier n'est pas plus difficile à détruire que la souche parentale : un temps quasi-identique d'exposition du désinfectant est nécessaire pour réduire leur nombre de 100 000 fois.

D'un point de vue mécanistique, la sensibilité diminuée à la ciprofloxacine observée pour ce mutant est due à une diminution de l'accumulation de la ciprofloxacine. Les mécanismes mis en jeu ne sont associés ni à une perte de porines (pas de modifications des profils des protéines membranaires et lipo-polysaccharides), ni à une mutation du gène codant pour la topoisomérase (cible de la ciprofloxacine) mais exclusivement à une surexpression de pompes à efflux. Point intéressant, les travaux montrent que la souche parentale qui présente le gène muté *gyrA*, responsable de la résistance à la ciprofloxacine, prédispose à une sélection de mutants avec une résistance plus élevée à la ciprofloxacine suite à l'exposition au produit à base d'aldéhyde.

Par ailleurs, ce mutant ne présente pas une moindre compétitivité par rapport à la souche parentale : leur capacité de croissance *in vitro* ainsi que leur capacité de colonisation et de persistance chez des poulets sont identiques. Ces résultats laissent supposer que le mutant pourrait survivre et persister dans l'environnement de l'élevage voire se disséminer tout au long de la chaîne alimentaire. Ces hypothèses restent cependant à être démontrées par des expérimentations dans des conditions de terrain.

Les travaux de Randall *et al.* (2007) montrent que des mutants ont été sélectionnés suite à l'exposition de souches bactériennes à un composé à base d'aldéhyde. Ces souches de laboratoire modifiées et de terrain sont cependant en nombre limité (n=8) et concernent des *Salmonella* d'un sérotype particulier (Typhimurium) et d'un phage type donné (DT 104).

De plus, dans cette même étude, des mutants produits suite à l'exposition à un oxydant et d'un produit phénicolé ont subi une analyse protéomique. Cette analyse n'a pas été réalisée pour le mutant exposé au produit contenant l'aldéhyde pour identifier les protéines surexprimées. Enfin, la composition de ce produit qui peut être complexe et contenir en plus de l'aldéhyde différentes substances actives et des co-ingrédients ne permet pas d'évaluer quelle pourrait être la contribution de l'aldéhyde sur le développement de résistance à la ciprofloxacine. Une étude sur l'aldéhyde seul permettrait de répondre à ce questionnement.

❖ **Analyse de l'article de Karatzas et al. (2008)**

L'intérêt de cette étude, est l'obtention de résultats contribuant à montrer que des désinfectants courants peuvent sélectionner des variants d'une souche *Salmonella* Typhimurium avec une sensibilité réduite aux antibiotiques (Karatzas et al., 2008). Ainsi, parmi les trois désinfectants d'élevage retenus, un produit contient une association de formaldéhyde, de glutaraldéhyde et d'ammonium quaternaire, et la souche test a été exposée à des concentrations sublétales avec des expositions quotidiennes, pendant 7 jours. De plus, la stabilité des phénotypes produits a été aussi évaluée. En conséquence, tous les variants produits présentent une réduction multiple de sensibilité aux antibiotiques. Des augmentations de CMI d'un facteur 8 pour la tétracycline et d'un facteur 4 pour le chloramphénicol et l'ampicilline sont observées par rapport aux valeurs de la souche initiale. Ensuite, des analyses fines des protéomes et des lipo-polysaccharides ont été réalisées, concluant que cette évolution de la résistance est en lien avec une diminution de la perméabilité de la paroi et une augmentation de l'efflux.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux, solides expérimentalement, démontrent qu'une sélection de souches de moindre sensibilité aux antibiotiques peut être mise en évidence après des contacts réitérés avec un produit contenant des aldéhydes. Cependant, compte tenu de la complexité de sa composition, il n'est pas possible de distinguer l'effet du formaldéhyde de celui des autres ingrédients. En outre, d'autres réserves peuvent être émises :

- l'absence de représentativité de cette seule souche pour le genre *Salmonella* ;
- l'utilisation de milieux de culture de laboratoire trop éloignés des conditions pratiques d'utilisation comme décontaminants des aliments ;
- l'absence de précisions sur les concentrations en produits et substances actives utilisés lors des contacts ;
- l'absence de précisions sur le contact, les sept réalisés ayant déclenché ce phénomène d'adaptation ;
- la non prise en compte des bactéries viables non cultivables qui pourrait révéler de faux résultats négatifs.

❖ **Analyse des articles de Frenzel et al. (2011) et Svetlikova et al. (2009)**

Même si le genre bactérien *Mycobacterium* est éloigné structurellement des bactéries à Gram négatif ciblées dans cette analyse, ces deux travaux apportent un éclairage sur leur capacité d'adaptation à des substances actives biocides de la famille des aldéhydes. Les travaux de Svetlikova étudient le rôle des porines sur la sensibilité de deux mycobactéries (*Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium chelonae*) (Svetlikova et al., 2009). A partir de ces mycobactéries à croissance rapide, des mutants sont produits notamment sur le gène *mspA* codant la porine MsPA dont l'importance au niveau de la membrane est connue. Cette délétion agit autant sur l'influx des nutriments que sur la résistance aux deux aldéhydes que sont le glutaraldéhyde et l'ortho-phtaldéhyde. Dans le même temps, cette même souche affiche une augmentation très significative de la résistance à des antibiotiques, d'un ordre de 4 à plus de 100, comme notamment la rifampicine, la vancomycine, la ciprofloxacine, l'érythromycine, la tétracycline. A la lumière de

ces travaux qui n'appellent pas de critiques de fond sur le plan méthodologique, la question se pose de son extrapolation aux genres bactériens que sont les bactéries à Gram négatif. Dans ce sens, il serait utile d'avoir des données, d'abord sur cet autre aldéhyde qu'est le formaldéhyde afin de préciser si la même stratégie serait adoptée pour le développement de cette résistance, puis d'apprécier la prévalence de cette résistance croisée ou pas avec celle visant les antibiotiques, ceci à partir d'un éventail de souches suffisamment représentatif. Suivant une démarche similaire, Frenzel *et al.* ont orienté leurs travaux sur *Mycobacterium smegmatis* en produisant un mutant isogénique notamment sur le gène *mspA* (Frenzel *et al.*, 2011). Parmi les produits biocides testés figurent deux substances génératrices de formaldéhyde, l'hexahydrotriazine et le méthylénbisoxazolidine. Se référant aux travaux de Svetlikova *et al.*, le constat est fait d'une moindre diminution de sensibilité. Enfin, ce travail n'a pas traité de la relation éventuelle avec la résistance de cette même bactérie aux antibiotiques.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DU CES

4.1. Bilan d'ordre méthodologique

Une première analyse globale des articles sélectionnés pour cette expertise met en évidence à la fois :

- ✓ L'absence totale d'études sur les aliments pour animaux, qui sont en majorité des aliments secs (environ 12% d'humidité), donc peu propices au développement bactérien ;
- ✓ Le très faible nombre d'études ciblant la relation entre les traitements décontaminants et le développement de l'antibiorésistance, notamment pour les salmonelles et plus largement les entérobactéries ;
- ✓ Le très faible nombre de souches bactériennes étudiées ;
- ✓ La diversité des approches méthodologiques choisies pour démontrer les effets de ces décontaminants sur le développement de l'antibiorésistance.

a) Concernant les acides organiques :

- ✓ Les acides organiques, potentiellement utilisables pour cet usage de décontamination des aliments pour animaux, représentent une large famille très hétérogène sur le plan de leur structure chimique et dans cette analyse un nombre limité d'entre eux a fait l'objet d'études. On retrouve essentiellement l'acide citrique, l'acide acétique et l'acide lactique. A côté de ceux-ci d'autres substances voisines ont aussi été étudiées, ce sont l'acide peracétique, le sel de sodium de l'acide benzoïque et le chlorite de sodium acidifié par de l'acide citrique. D'autres études seront nécessaires sur un éventail plus large d'acides organiques afin de représenter la diversité de cette famille chimique.
- ✓ Les concentrations en acides organiques retenues dans ces études sont globalement d'un même ordre de grandeur que les doses d'emploi classiquement utilisées sur le terrain. Au regard de la définition de cette nouvelle catégorie de produits, les effets attendus sont de nature bactéricide.

- ✓ Pour la majorité de ces études, le nombre de souches était très faible. Certaines études se limitent à une seule souche bactérienne. Seules, deux études portent sur plusieurs souches, dont l'une sur une flore naturelle. Quoiqu'il en soit, l'ensemble de ces résultats et conclusions ne permet pas une extrapolation à l'ensemble des espèces bactériennes d'intérêt. En conséquence, des études devront être menées sur une plus large variété de souches bactériennes autant qualitativement que quantitativement pour qu'elles soient représentatives des souches rencontrées dans les milieux à traiter.
- ✓ Dans les protocoles opératoires qui ont été retenus dans ces études, les choix méthodologiques sont tous différents.
 - En premier lieu, à l'exception d'une étude utilisant une matrice d'origine animale (cuisses de poulets), tous ces essais ont été conduits exclusivement dans des conditions de laboratoire au moyen de milieux de culture inoculés par les espèces bactériennes d'intérêt ;
 - En deuxième lieu, les contacts « produits de traitement – souches bactériennes » sont de nature très différente suivant les études ; pour certaines ce sont des contacts uniques de durée variable (15 min ou 24h), pour d'autres ce sont des contacts réitérés quotidiennement (7 à 20 contacts) sans savoir précisément à quel moment se déclenche le phénomène d'adaptation des bactéries testées ;
 - En troisième lieu, les évaluations des diminutions de sensibilité aux produits décontaminant sont exprimées différemment suivant les études ; le critère d'augmentation des CMI ou de diminution de la réduction des titres bactériens a été retenu. De la même manière, pour le suivi ou le développement de l'antibiorésistance, le critère d'augmentation de CMI ou l'utilisation de disques chargés en antibiotiques pour la réalisation d'antibiogramme a été retenu. Cette diversité démontre à quel point un besoin de standardisation de ces approches méthodologiques est nécessaire afin à la fois de rendre objectifs ces phénomènes et de pouvoir comparer les résultats et conclusions de ces études entre elles.
- ✓ Dans aucune de ces études il n'est envisagé la recherche des bactéries viables et non cultivables qui pourraient être à l'origine d'une moindre détection, de bactéries antibiorésistantes.
- ✓ Dans les études à venir, il faudra aussi bien distinguer ce qui relève de l'apparition d'une résistance stable liée à des mutations, de ce qui relève d'une pression de sélection de bactéries antibiorésistantes préexistantes suite à l'application de traitements à base d'acides organiques. Le coût biologique pour ces bactéries devra aussi être évalué ainsi que la nature des mécanismes qui sous-tendent ces phénomènes.

b) Concernant le formaldéhyde :

Un grand nombre d'observations et propositions citées pour les acides organiques s'appliquent également pour le formaldéhyde :

- ✓ le faible nombre de souches bactériennes testées dans chacune des études ;
- ✓ la non représentativité des souches retenues au regard des objectifs visés par l'utilisation de ces produits décontaminant les aliments pour animaux ;
- ✓ l'absence d'études sur ces aliments pour animaux ;
- ✓ la diversité des protocoles opératoires rendant difficile l'établissement d'un lien avec les conditions réelles d'utilisation de ce produit ou, *a minima*, une comparaison des résultats et conclusions ;
- ✓ la non prise en compte des bactéries viables non cultivables dans cette recherche d'isolats bactériens développant éventuellement une antibiorésistance.

Par ailleurs, un point faible de ces études est le défaut de précisions sur la nature exacte des composants des produits utilisés, ces études étant essentiellement réalisées avec des produits commerciaux souvent complexes et non la substance active formaldéhyde seule. Dans ces conditions, il est impossible d'évaluer la part du formaldéhyde dans les phénomènes observés. De la même manière, il faut noter des imprécisions quant à la diversité des concentrations en formaldéhyde utilisées dans ces études.

4.2. Conclusions de l'expertise collective

Concernant les acides organiques et le formaldéhyde, sur la base des études expérimentales analysées dans le cadre de cette expertise, on constate que des phénomènes d'adaptation de souches bactériennes, après contacts avec certains de ces produits, peuvent engendrer soit des diminutions de sensibilité à certains antibiotiques, soit une évolution des phénotypes de résistance à des antibiotiques, des souches passant du statut de sensible à résistant de manière stable. Ces phénomènes sont explicables, soit par des mutations sur des gènes responsables, soit par la diminution de la perméabilité des parois bactériennes ou/et l'augmentation de l'efflux, mécanismes communs à de nombreuses substances comme les biocides et les antibiotiques.

Cependant, considérant :

- la non représentativité des démarches méthodologiques mises en place dans ces études très éloignées des conditions d'utilisation sur le terrain ;
- le nombre très limité de souches bactériennes étudiées notamment du genre *Salmonella* voire autres entérobactéries ;
- la représentativité limitée de ces souches au regard des objectifs de décontamination des aliments pour animaux ;
- le faible nombre d'acides organiques testés au regard de la liste de ces substances communément citée et de l'impossibilité d'isoler le formaldéhyde des formulations commerciales testées ;
- le nombre très limité d'études,

les données scientifiques disponibles aujourd'hui ne permettent pas de conclure définitivement sur ce risque de développement de l'antibiorésistance chez les bactéries du genre *Salmonella* après un traitement de décontamination des aliments pour animaux par les acides organiques ou le formaldéhyde.

5. CONCLUSIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du CES « Alimentation animale ».

La direction générale

MOTS-CLES

Antibiorésistance, décontaminant, salmonelles, antibiotique, additif, alimentation animale

BIBLIOGRAPHIE

- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., Capita, R. et Pietro, M., 2009. Comparaison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritica* strains preexposed and exposed to poultry decontaminants. *Food control*, 20: 1108-1011.
- Alonso-Hernando, A., Capita, R. et Alonso-Calleja, C., 2012. Behaviour of co-inoculated pathogenic and spoilage bacteria on poultry following several decontamination treatments. *Int J Food Microbiol.*, 159: 152-9.
- Alvarez-ordonez A., P., M., Bernado, A., Hill, C., Lopez, M., 2012. The acid tolerance response of *Salmonella* spp.: an adaptative strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food research international*, 45: 482-492.
- Ando, M., Yoshimoto, T., Ogushi, S., Rikitake, K., Shibata, S. et Tsuru, D., 1979. Formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. Purification and some properties. *J Biochem*, 85: 1165-72.
- Anses, 2014. Avis de l'Anses relatif à la création d'un nouveau groupe fonctionnel d'additif destiné à décontaminer les aliments pour animaux.
- Bailey, A.M., Constantinidou, C., Ivens, A., Garvey, M.I., Webber, M.A., Coldham, N., Hobman, J.L., Wain, J., Woodward, M.J. et Piddock, L.J., 2009. Exposure of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to triclosan induces a species-specific response, including drug detoxification. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64: 973-985.
- Bilgili, S.F., Conner, D.E., Pinion, J.L. et Tamblyn, K.C., 1998. Broiler skin color as affected by organic acids: influence of concentration and method of application. *Poult Sci.*, 77: 752-7.
- Bowers, J.W., Townsend, J.C. et McKee, S.R., 2008. The microbial and quality properties of poultry carcasses treated with peracetic acid as an antimicrobial treatment. *Bauermeister. Poult Sci.*, 87: 2390-8.
- Bucher, O., Fazil, A., Rajić, A., Farrar, A., Wills, R. et McEwen, S.A., 2012. Evaluating interventions against *Salmonella* in broiler chickens: applying synthesis research in support of quantitative exposure assessment. *Epidemiol Infect.*, 140: 925-45.
- Capita, R., 2007. Variation in *Salmonella* resistance to poultry chemical decontaminants, based on serotype, phage type, and antibiotic resistance patterns. *J Food Prot*, 70: 1835-43.
- Capita, R., Alvarez-Fernandez, E., Fernandez-Buelta, E., Manteca, J. et Alonso-Calleja, C., 2013. Decontamination treatments can increase the prevalence of resistance to antibiotics of *Escherichia coli* naturally present on poultry. *Food Microbiol*, 34: 112-7.
- Chapman, J.S., 2003. Biocide resistance mechanisms. *International biodeterioration and biodegradation*, 51: 133-138.
- Cloete, T.E., 2003. Resistance mechanisms of resistance bacteria to antimicrobial compounds. *International biodeterioration and biodegradation*, 51: 277-282.
- Davidson M., H.A., 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials sanitizers, and other process controls. *Foodtechnology*, 56.
- Fraqueza, M.J., Martins, A., Borges, A.C., Fernandes, M.H., Fernandes, M.J., Vaz, Y., Bessa, R.J. et Barreto, A.S., 2014. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* spp. strains isolated from different poultry production systems at slaughterhouse level. *Poult Sci.*, 93: 1578-86.
- Frenzel, E., Schmidt, S., Niederweis, M. et Steinhauer, K., 2011. Importance of porins for biocide efficacy against *Mycobacterium smegmatis*. *Appl Environ Microbiol*, 77: 3068-73.
- Grkovic, S., Brown, M.H. et Skurray, R.A., 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66: 671-701.
- Guerin-Mechin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B. et Leveau, J.Y., 1999. Specific variations of fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 induced by quaternary ammonium compounds and relation to bactericidal activity *Journal of applied microbiology* 87: 735-742.
- Hansen, L.H., Jensen, L.B., Sorensen, H.I. et Sorensen, S.J., 2007. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 60: 145-7.
- Heinzel, M., 1986. On the influence of different growth conditions to the resistance of some methylotrophic bacteria to aldehydes. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B*, 182: 299-309.
- Kato, N., Shirakawaka, K., Kabayashi, H. et Sakazawa, C., 1982. The dismutation of aldehydes by bacterial enzyme. *agric.biol.chem*, 1: 39-46.

- Karatzas, K.A., Randall, L.P., Webber, M., Piddock, L.J., Humphrey, T.J., Woodward, M.J. et Coldham, N.G., 2008. Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants. *Appl Environ Microbiol*, 74: 1508-16.
- Kummerle, N., Feucht, H.H. et Kaulfers, P.M., 1996. Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 40: 2276-9.
- Kunonga, N., I., Sobieski, R.J. et Crupper, S.S., 2000. Prevalence of the multiple antibiotic resistance operon mar RAB in the genus of *Salmonella*. *FEMS Microbiology Letters*, 187: 155-160.
- Mani-Lopez, E., Garcia, H.S., Lopez-Malo, A., 2012. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food research international*, 45: 713-721.
- Martin, H., Maris, P., 2012. *Journal of Applied Microbiology* 113: 578-590.
- Ogushi, S., Ando, M. et Tsuru, D., 1984. Formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: a zinc metalloenzyme. *J Biochem*, 96: 1587-91.
- Potenski, C.J., Gandhi, M. et Matthews, K.R., 2003. Exposure of *Salmonella Enteritidis* to chlorine or food preservatives decreases [corrected] susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett*, 220: 181-6.
- Rajkovic, A., Smigic, N., Uyttendaele, M., Medic, H., de Zutter, L. et Devlieghere, F., 2009. Resistance of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* after exposure to repetitive cycles of mild bactericidal treatments. *Food Microbiol*, 26: 889-95.
- Randall, L.P., Cooles, S.W., Coldham, N.G., Penuela, E.G., Mott, A.C., Woodward, M.J., Piddock, L.J. et Webber, M.A., 2007. Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *J Antimicrob Chemother*, 60: 1273-80.
- Randall, L.P., Cooles, S.W., Piddock, L.J. et Woodward, M.J., 2004. Effect of triclosan or a phenolic farm disinfectant on the selection of antibiotic-resistant *Salmonella enterica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 621-627.
- Randall, L.P., et al., 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: 1273-80.
- Russell, A., D., 2002. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction. *Journal of applied microbiology*, 1S-3S: 92.
- SCENIHR, 2009. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*.
- Smulders, F.J. et Greer, G.G., 1998. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *Int J Food Microbiol.*, 10: 149-69.
- Sondossi, M., Rossmore, H.W. et Williams, R., 1989. Relative formaldehyde resistance among bacterial survivors of biocide-treated metalworking fluid. *International biodeterioration and biodegradation*, 25: 423-437.
- Sondossi, M., Rossmore, H.W. et Wireman, J.W., 1986. Induction and selection of formaldehyde-based resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of industrial microbiology*, 1: 97-103.
- Sundin, G.W. et Weigand, M.R., 2007. The microbiology of mutability. *FEMS Microbiol Lett*, 277: 11-20.
- Svetlikova, Z., Skovierova, H., Niederweis, M., Gaillard, J.L., McDonnell, G. et Jackson, M., 2009. Role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 4015-8.
- Tattawasart, U., Maillard, J.Y., Furr, J.R. et Russell, A.D., 1999. Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. *Journal of Hospital Infection*, 42: 219-29.
- Zhang, L., Jeong, J.Y., Janardhanan, K.K., Ryser, E.T. et Kang, I., 2011. Microbiological quality of water immersion-chilled and air-chilled broilers. *J Food Prot.*, 74: 1531-5.
- Zhao, B. et Houry, W.A., 2010. Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria: an aptitude for survival. *Biochem Cell Biol.*, 88: 301-14.