

Biocides désinfectants et résistance aux antibiotiques aspects génétiques et environnementaux

Philippe Carencio, médecin hygiéniste
CPIAS PACA - CH Hyères - CH Brignoles- EMH Var - GIP COMET

Réso InfectiO Paca-Est
Nice 30 juin 2021

Aspects
génétiques :

Multiplicité,
Diversité,
Mobilité

Résistome global

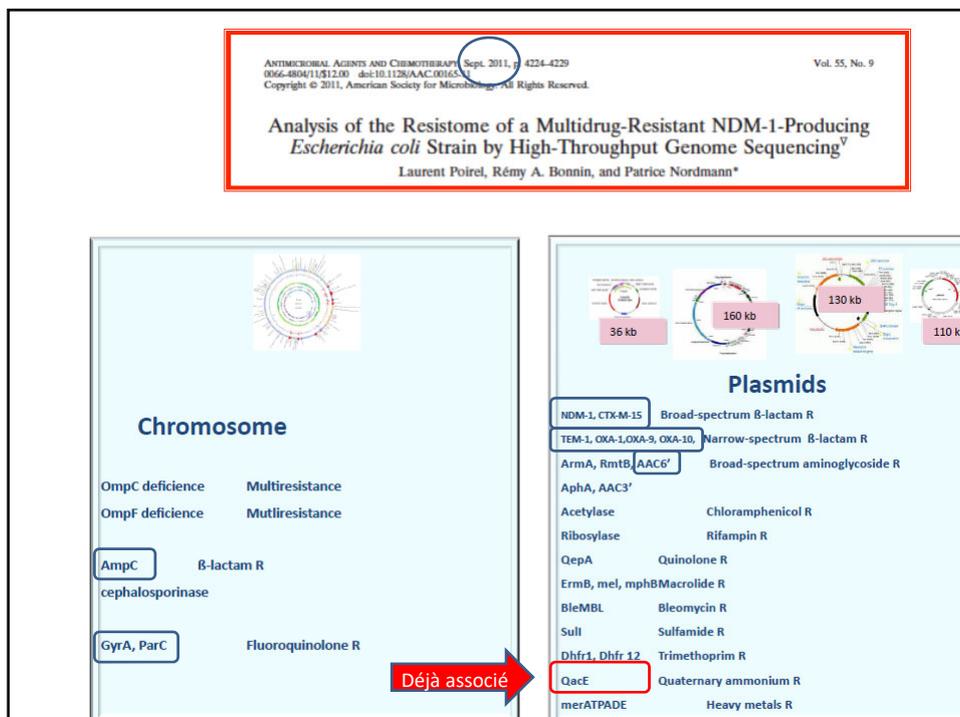
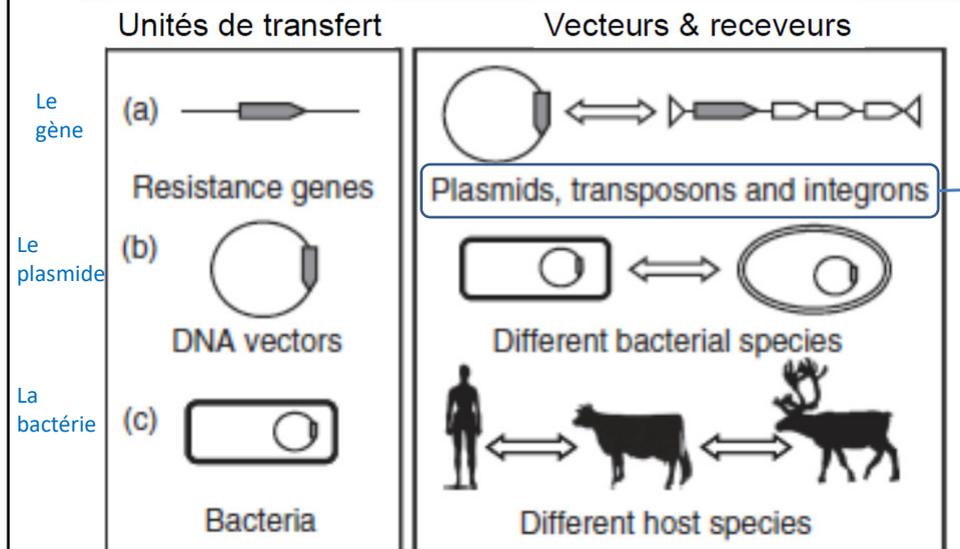
- Ensemble des données de séquences de génomes bactériens disponibles
- = 20 000 gènes de résistance de 400 types différents

Liu & Pop, 2009, Nucleic Acid Res

Capacité d'émergence des résistances

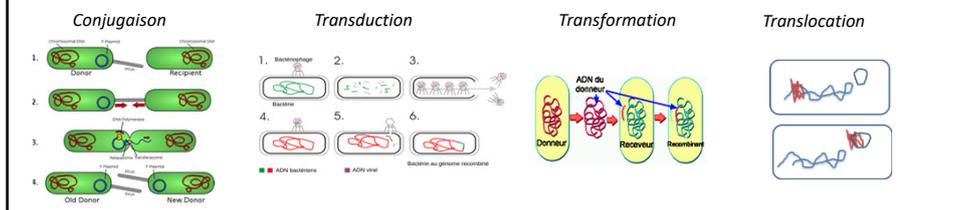
- Richesse du résistome
- Plasticité génomique (ex : transfert latéral de gènes)
- Unicité du monde microbien homme/animal/environnement

Différentes perspectives du mouvement et de la mobilisation de gènes assurant la résistance aux antibiotiques (Stokes & coll, 2011, FEMS Microbial Rev)

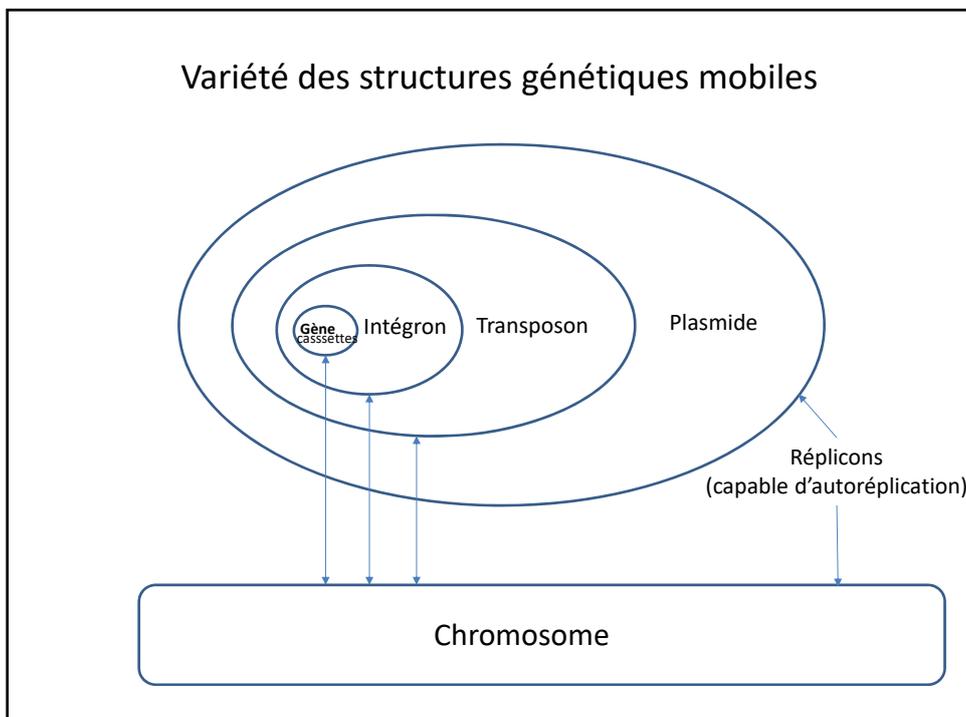


Le transfert de gènes de résistance

- Entre bactéries provenant des différents **microbiotes** : humain, animal, environnemental
- dans l'environnement hospitalier, dans le milieu naturel
- notamment dans les **stations d'épuration**, un des carrefours principaux d'échange de matériel génétique entre les bactéries (via les pseudomonacées)
- Au sein des communauté bactériennes complexes organisées en **biofilm**,
- Siège des communications entre bactéries via des **signaux moléculaires** permettant l'expression collective de gènes régulée par la taille de la population (Quorum sensing).



Variété des structures génétiques mobiles

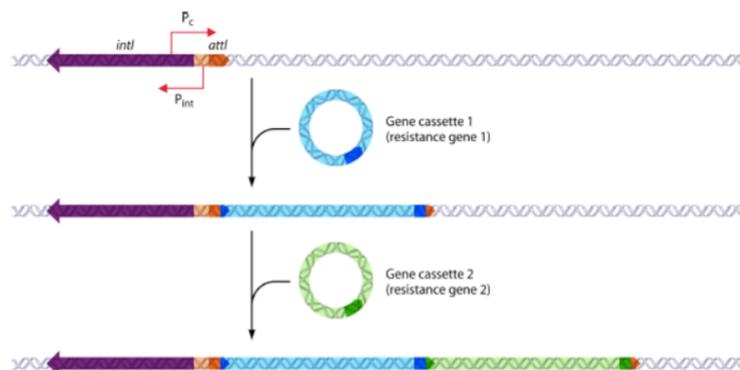


Les Intégrons

- Très anciens , exclusivement bactériens
- Capables de capturer des gènes individuels localisés sur des « cassettes » mobiles
- Localisés dans les éléments génétiques très mobiles (plasmides et transposons)
- Le plus souvent associés au reste d'un transposon déficient (Tn 402/Tn 5070 /Tn21)
- 3 classes selon la composition de leur intégrase
- Les intégrons de classe 1 sont très majoritaires comme supports des gènes de résistance aux antibiotiques et dérivent d'un ancêtre commun

Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes jouant un rôle important dans l'acquisition et la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Le mouvement des cassettes permet une mosaïque de combinaisons. La découverte récente des super-intégrons indique que ce système de génie génétique au naturel a de plus amples implications dans l'évolution du génome bactérien que la simple dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques.

Porteurs/vecteurs de cassettes de résistance: intégron



Principalement chez les bactéries à Gram négatif. Capture, expression, dissémination de gènes permettant l'adaptation bactérienne à des contraintes environnementales (antibiotiques, etc...)

Structure et processus de capture de cassettes:

Intégrase (int) + promoteurs (P_{int} & P_c) à son extrémité 3' et séquence d'attachement/insertion (attI)

Le plasmide peut comporter des transposons et des intégrons

Les intégrons peuvent être fixés dans les transposons

Diversité d'intégrons codant pour des enzymes de résistance, Gram -

Intégrons de classe 1

Résistance aux β -lactamines

β -lactamases classes A, C, D
 β -lactamases classe B

Résistance aux aminosides

6' - acétyltransférases
3 - acétyltransférases
2'' - adénylyltransférases
3'' - adénylyltransférases

Résistance au chloramphénicol

acétyltransférases
mécanisme non enzymatique

Résistance au triméthoprime

dihydrofolate réductases
classes A et B

Résistance à la rifampicine

ADP-ribosyl transférase

Résistance à l'érythromycine

érythromycine estérase

Résistance aux ammoniums quaternaires

Rôle des antiseptiques, en particulier des ammonium quaternaires, comme pression sélective ?
(Sansonetti, 2015)

Intégrons de classe 2

Résistance aux aminosides

3'' - adénylyltransférases

Résistance à la streptomycine

acétyltransférase

Résistance au triméthoprime

dihydrofolate réductases
classes A et B

Intégrons de classe 3

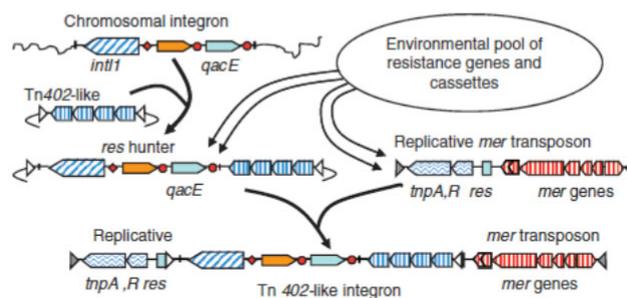
Résistance aux β -lactamines

β -lactamases classe B

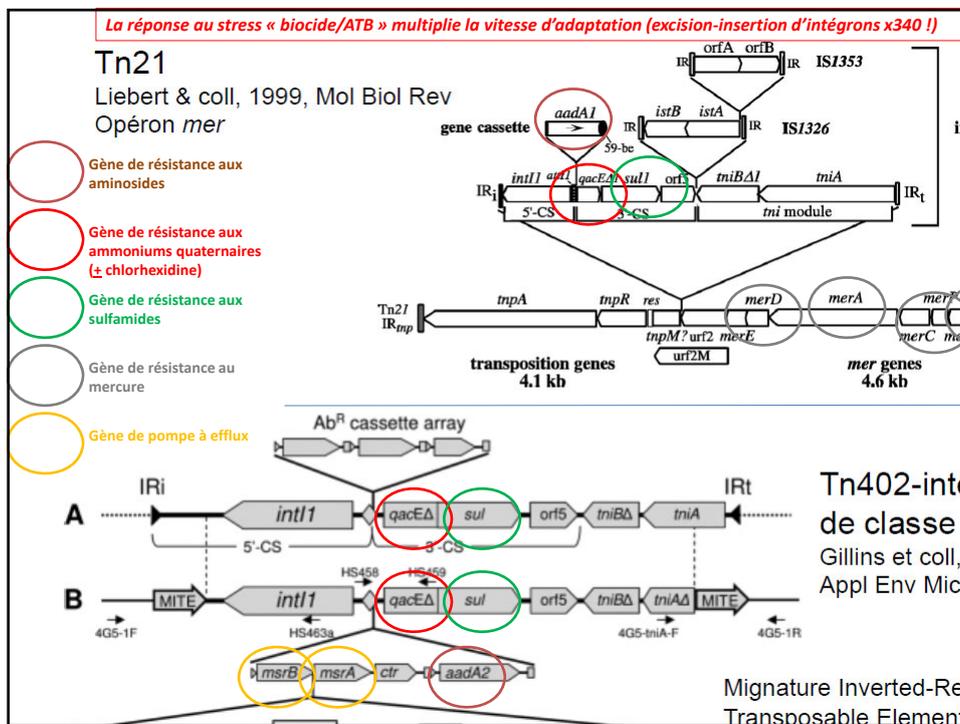
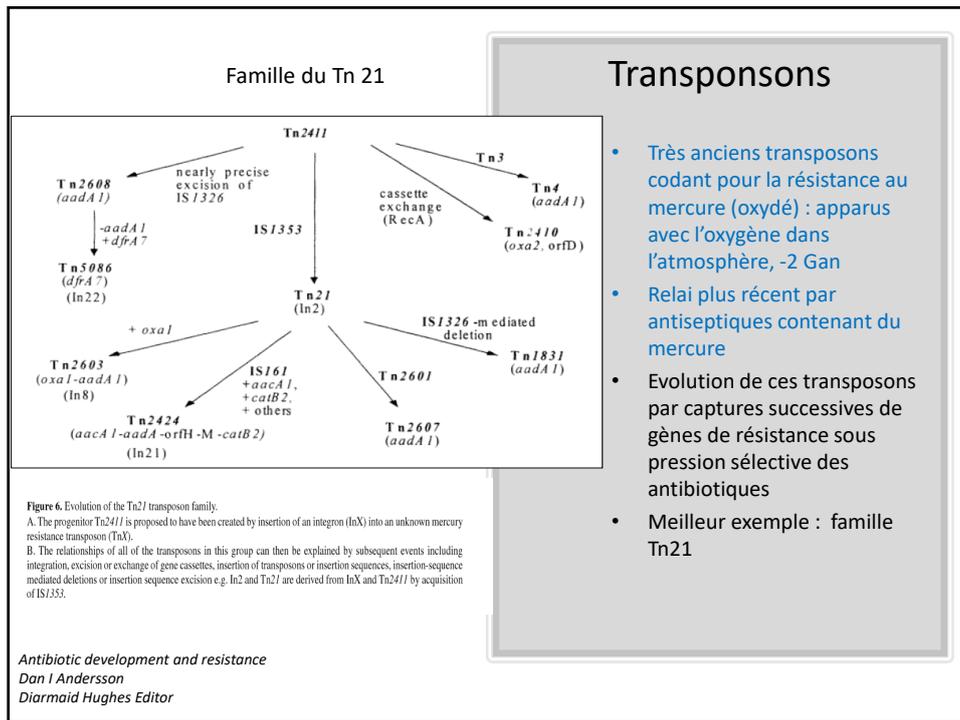
Résistance aux aminosides

6' - acétyltransférases

Modèle de construction séquentielle d'éléments génétiques "ultramobiles" au sein des bactéries à Gram - "contemporaines"



Les désinfectants ont sélectionné des gènes de résistance aux ammoniums quaternaires dans des intégrons de classe 1 avant les antibiotiques. Cette structure s'est liée à Tn402 (Tn délété) et est devenue mobile. L'usage des antibiotiques y a amené le recrutement de gènes d'antibiorésistance. En parallèle, la contamination de l'environnement microbien (naturel ou thérapeutique) par le mercure a permis le recrutement indépendant de gènes d'antibiorésistance en association avec la résistance au mercure. Les capacités de "res-hunting" (préférence d'insertion dans le gène de la résolution (res) du transposon cible) de Tn402 ont permis de fusionner les systèmes



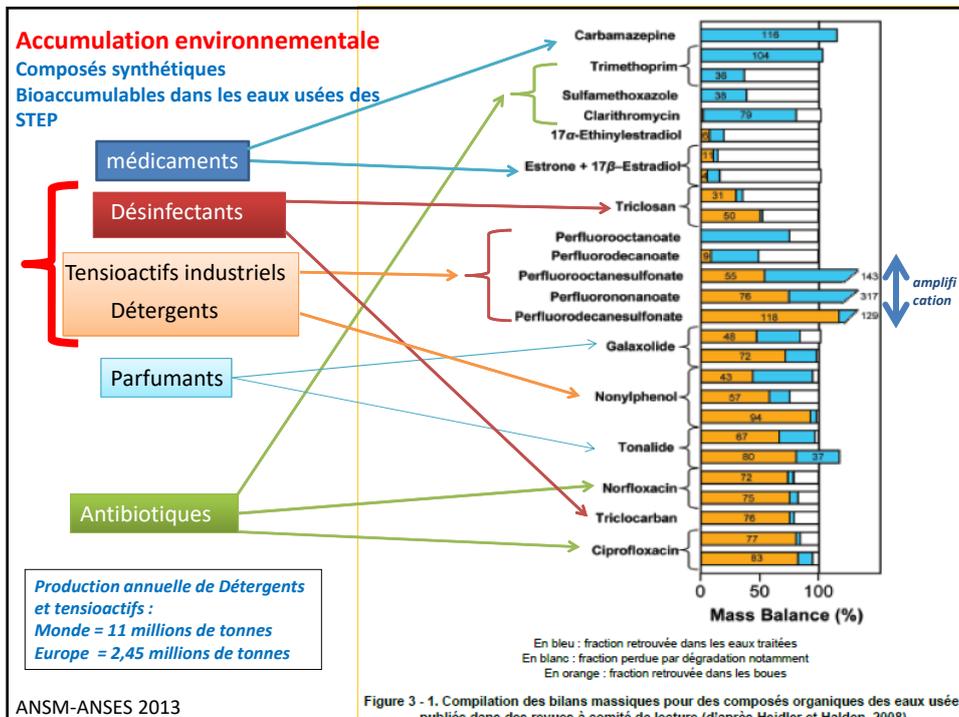
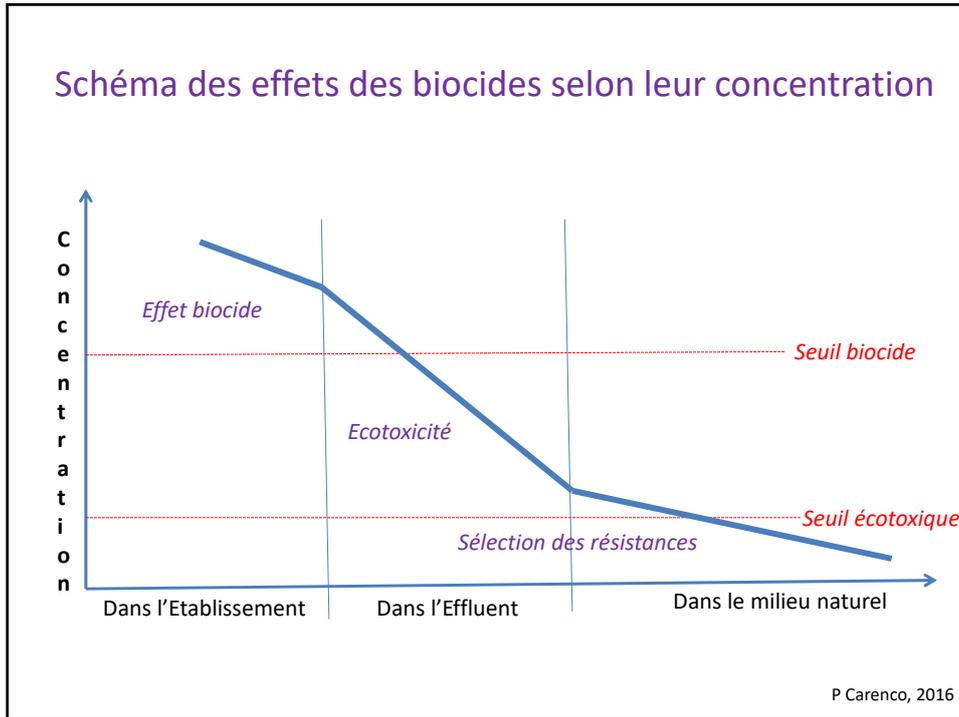
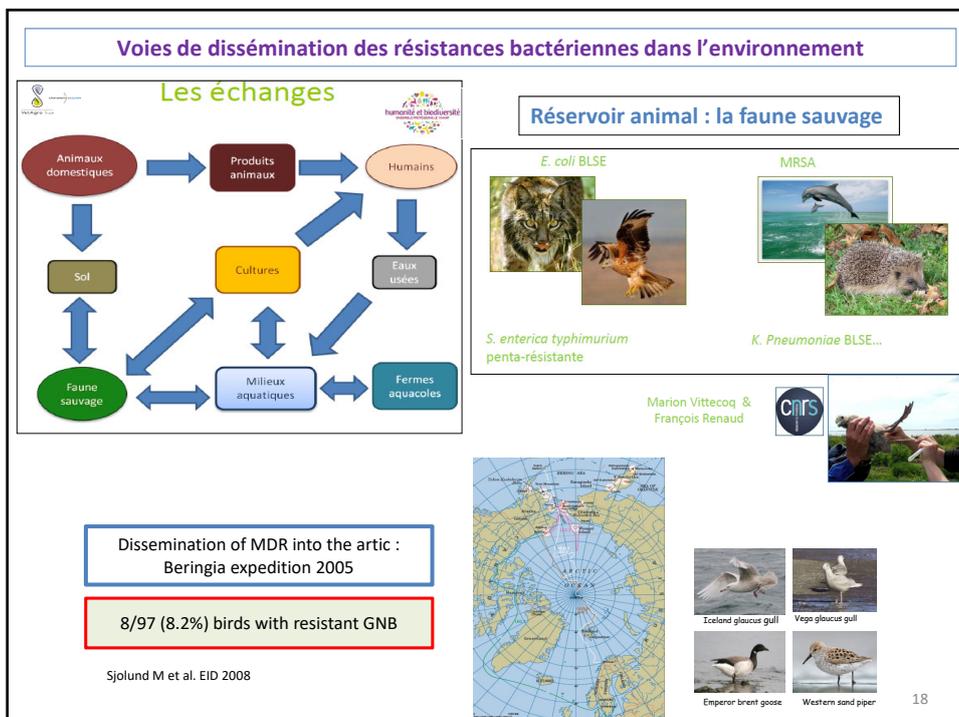
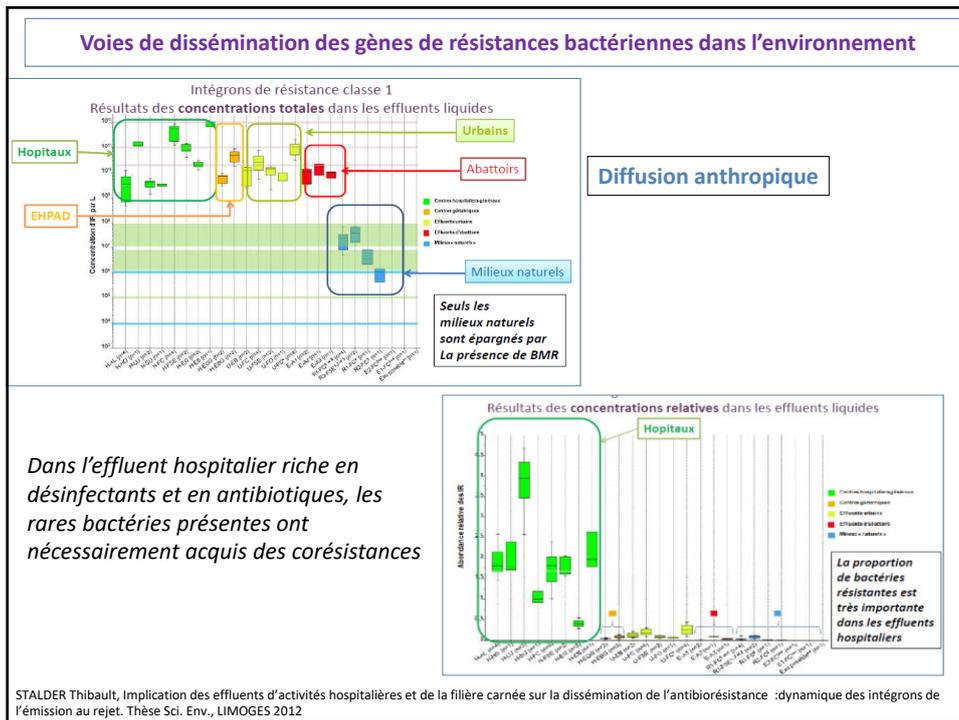
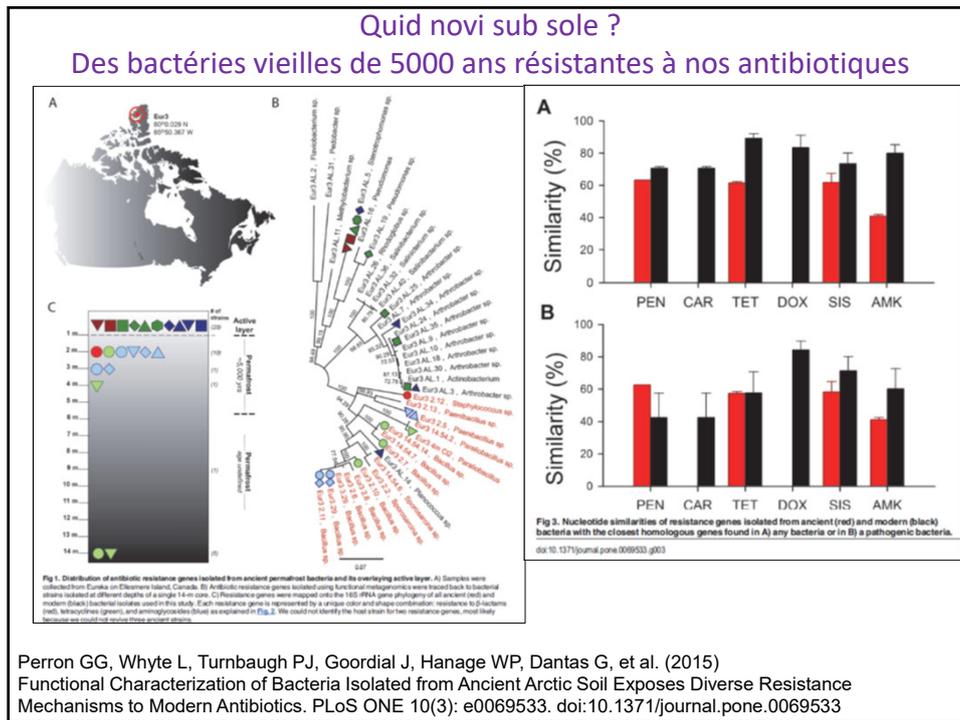


Figure 3 - 1. Compilation des bilans massiques pour des composés organiques des eaux usées publiés dans des revues à comité de lecture (d'après Heidler et Halden, 2008).





Obésité infantile et produits désinfectants

- Canada, 2018
- 757 enfants suivis de la naissance à 3 ans
- Sélectionnés selon l'usage ou non de désinfectants dans les produits de ménage
- Bilan à 3-4 mois : mensurations (IMC), prélèvement microbiote intestinal
- Bilan à 1 an et trois ans : mensurations (IMC)
- Analyse de nombreux facteurs sociaux et médicaux

Ménage avec produits désinfectants

↓

Modification de la flore intestinale

↓

Bébé en surpoids

Le microbiote intestinal est différent

Characteristic	No. of infants with higher exposure to disinfectant, n (%)†	p value‡	No. of infants with higher exposure to eco-friendly products, n (%)†	p value‡
Overweight or obesity at 3 yr (n = 675)				
No (n = 609)	311 (51.5)	0.1	301 (49.4)	0.0001
Yes (n = 66)	42 (63.6)		17 (25.8)	

Exposés aux désinfectants ?	OUI	NON
% d'enfants en surpoids	10,4%	4,7%

Antibacterial cleaning products have the capacity to change the environmental microbiome and alter risk for child overweight.

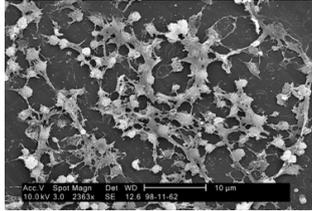
Exemple de perturbation endocrinienne indirecte, par effet sur la composition du microbiote intestinal

Postnatal exposure to household disinfectants, infant gut microbiota and subsequent risk of overweight in children
Mon H. Tun MBBS MSc, Hein M. Tun DVM PhD, Justin J. Mahoney MSc, Theodore B. Konya MSc, David S. Guttman PhD, and at CMAJ 2018 September 17;190:E1097-1107. doi: 10.1503/cmaj.170809

Rôle du Biofilm, à toutes échelles : la « crasse »

MICROscopique

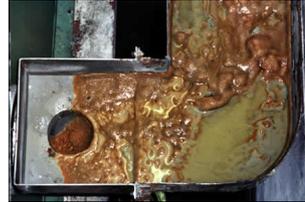
S.Aureus sur un catheter



CDC/ Janice Carr

MACROscopique

Biofilm en milieu aqueux



Plaque dentaire



Michael Ottenbruch — Dentist Thornhill



Stromatolite du pré-cambrien
Biofilm fossile



Sur une turricule de taupinière



Algues constituées en biofilm de surface

D'après : P. Carrara, NPS — National Park Service -
http://www.nature.nps.gov/geology/ct/projects/photodb/Photo_Detail.cfm?PhotoID=204

Lamiot — Travail personnel, CC BY 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3198854>

Lamiot — Travail personnel, CC BY 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3198854>

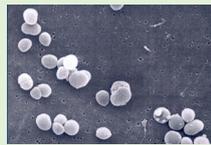
21

Phénotypes (formes de vie) bactériens

Métaboliquement active

Forme végétative

EN LABORATOIRE
Phénotype
planctonique
Croissance rapide
Sensibilité biocides



DANS LA NATURE
Phénotype biofilm
Matrice imperméable
Lieu d'échanges

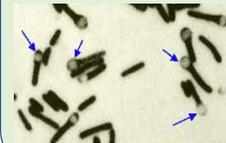


Métaboliquement inactive

Forme sporulée

PERSISTANCE
Phénotype spore

Résistance physico-chimique



22

Atteindre la population suffisante pour s'organiser : le Quorum sensing

A cette échelle de taille, les forces électrostatiques jouent un rôle important

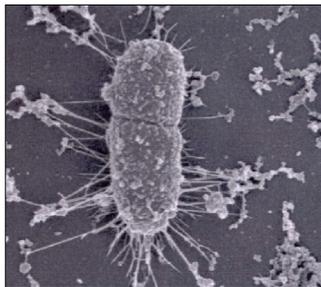
(i) **Quorum sensing (QS) global genetic regulation system responds to cell population density and coordinates group behaviours among bacterial communities**

<p>Gram-positive bacteria Auto-inducing peptide (AIP) mediated QS Phosphorylation cascade e.g. agr/DCA operon in <u>Staphylococcus aureus</u></p>	<p>Gram-negative bacteria Acylated homoserine lactone (AHL)/Autoinducer-1 (AI-1) QS system e.g. luxI/luxR system in <u>Vibrio harveyi</u>/ Autoinducer-3 (AI-3) e.g. QseBC system in <u>Aeromonas hydrophila</u></p>	<p>Gram-positive and negative bacteria Autoinducer-2 (AI-2) e.g. <u>luxS</u> in <u>Escherichia coli</u></p>
--	---	--

- 1. La densité de population augmente** → concentration des médiateurs → activation du phénotype QS
- 2. Mouvements actifs d'attachement** → développement d'appendices de liaison → Adhésion
- 3. Accroissement par effets électrostatiques et liaisons faibles** : recrutement
- 4. Agrégation cellulaire** → production de la matrice polysaccharidique externe (ExoPolymeriqueSubstance)
- 5. Régulation du biofilm actif** (contrôle génétique du QS) et passif (cisaillement par le flux de circulation)

Coughlan LM, Cotter PD, Hill C, Alvarez-Ordóñez A. New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1641. doi:10.3389/fmicb.2016.01641. 23

L'adhésion bactérienne est initiée dès les premières minutes de contact



Bactérie adhérentes par des appendices (pili, curli, fimbriae, ...) auto-induits par les signaux du Quorum sensing.

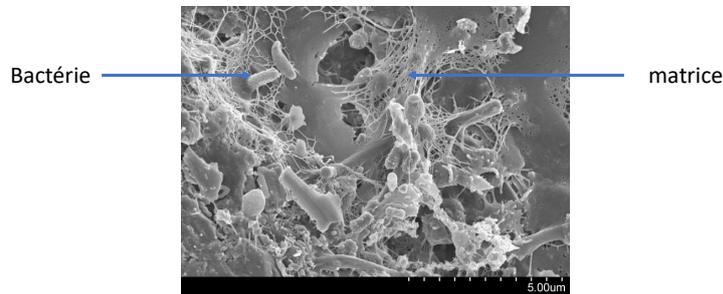
Chronologie de formation du biofilm

Formation d'un biofilm de *S. aureus* sur matériel

 2 h Fixation des <i>S. aureus</i> sur des irrégularités à la surface du matériel	 4 h Début de fabrication du "slime"	 8 h La surface du matériel est recouverte par une couche épaisse de "slime"	 24 h Des bactéries émergent du biofilm, libres et, prêtes à se fixer ailleurs
--	---	---	---

Olson, et al. J. Biomed Mater Res 1988

Composition de la matrice du biofilm



- Substances produites par les bactéries (ou l'hôte si tissu vivant)
 - **Polysaccharides**, lipides, protéines, ADN, ARN, éléments minéraux
La chitine des insectes et la cellulose des végétaux, leur « squelette », sont aussi des polysaccharides
 - **EAU +++** : assure les besoins en métabolisme réduit (eau disponible piégée)
 - Excréments, déchets métaboliques, bactéries mortes, produits de nettoyage, imports
- Tous ces éléments pouvant servir de signaux intercellulaires pour activer les gènes du quorum sensing (plasmidiques ou chromosomiques)

25

Rôles de protection du biofilm (1/3)

- Protection passive
 - Barrière physique contre l'entrée des agents antimicrobiens : **désinfectants, antiseptiques, antibiotiques, anticorps**
 - Densité augmentée en milieu sec : résistance aux **détergents**
- Protection métabolique
 - Activité ralentie, besoins moindres
 - Piégeage de l'eau et des substances nutritives apportées
- Protection active
 - Activation de mécanismes de protection actifs (pompe à efflux)
 - Ouverture de **canaux aqueux de distribution** des nutriments et voies de communication biochimiques

L'action physique de cisaillement ou cassure de la matrice est le meilleur moyen de destruction

26

Rôles de protection du biofilm (2/3)

Table 1: Persistence of clinically relevant bacteria on dry inanimate surfaces.

Type of bacterium	Duration of persistence (range)
<i>Acinetobacter</i> spp.	3 days to 5 months
<i>Bordetella pertussis</i>	3 – 5 days
<i>Campylobacter jejuni</i>	up to 6 days
<i>Clostridium difficile</i> (spores)	5 months
<i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>C. trachomatis</i>	≤ 30 hours
<i>Chlamydia psittaci</i>	15 days
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	7 days – 6 months
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1–8 days
<i>Escherichia coli</i>	1.5 hours – 16 months
<i>Enterococcus</i> spp. including VRE and VSE	5 days – 4 months
<i>Haemophilus influenzae</i>	12 days
<i>Helicobacter pylori</i>	≤ 90 minutes
<i>Klebsiella</i> spp.	2 hours to > 30 months
<i>Listeria</i> spp.	1 day – months
<i>Mycobacterium bovis</i>	> 2 months
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1 day – 4 months
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 – 3 days
<i>Proteus vulgaris</i>	1 – 2 days
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 hours – 16 months; on dry floor: 5 weeks
<i>Salmonella typhi</i>	6 hours – 4 weeks
<i>Salmonella typhimurium</i>	10 days – 4.2 years
<i>Salmonella</i> spp.	1 day
<i>Serratia marcescens</i>	3 days – 2 months; on dry floor: 5 weeks
<i>Shigella</i> spp.	2 days – 5 months
<i>Staphylococcus aureus</i> , including MRSA	7 days – 7 months
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 – 20 days
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3 days – 6.5 months
<i>Vibrio cholerae</i>	1 – 7 days

How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review

Nos BHRé préférées

Cela explique pourquoi on observe tant de variation dans les études de durée de survie des bactéries sur les surfaces

Kramer A, Schwelke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 2006;6:130. doi:10.1186/1471-2334-6-130.

27

Rôles de protection du biofilm (3/3)

La biodiversité est un facteur favorable à la survie des colonies bactériennes

- Protection génétique
 - Échanges de matériel génétique (plasmides, transposons) confèrent les résistances aux désinfectants et aux antibiotiques
 - Multiplication par un facteur x50 à x1 000 des CMI/CMB des antibiotiques et désinfectants par activation grâce aux signaux biochimiques échangés

TABLE 4. Susceptibility of planktonic and biofilm bacteria to selected antibiotics

Reference	Organism	Antibiotic	MIC or MBC of planktonic phenotype (µg/ml)	Concn effective against biofilm phenotype (µg/ml)
215	<i>S. aureus</i> NCTC 8325-4	Vancomycin	2 (MBC)	20 ^a
26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Imipenem	1 (MIC)	>1,024 ^b
26	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Ampicillin	2 (MIC)	512 ^b
208	<i>P. pseudomallei</i>	Ceftazidime	8 (MBC)	800 ^c
114	<i>Streptococcus sanguis</i> 804	Doxycycline	0.063 (MIC)	3.15 ^d

^a Concentration required for 99% reduction.
^b Minimal biofilm eradication concentration.
^c Concentration required for ~99% reduction.
^d Concentration required for >99.9% reduction.

Biofilms : Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Rodney M Donlan, JW Costerton. *Clinical Microbiology Reviews* 15;2:167-193

28

Biofilms en milieux secs hospitaliers

- Mise en évidence récente (2012, 2015)
 - En milieu de réanimation en Australie (utilisateurs de Javel)
 - A la recherche de réservoirs de BMR/BHR
 - Par des prélèvements destructeurs et pas des appositions
- Rôle restant à déterminer dans les IAS
 - Mode de constitution et d'entretien peu étudiés
 - Mécanismes de transmission à élucider
 - Moyens de prévention jusqu'à ce jour : amère désillusion ?

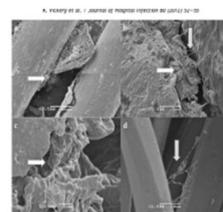


Figure 3. Scanning electron micrographs of biofilms on different dry surfaces. (a) biofilm on surface at 1000x magnification. (b) biofilm on surface at 7500x magnification. (c) biofilm on surface at 12000x magnification. Horizontal arrows indicate spores embedded in exopolysaccharide (EPS). Vertical arrows indicate removal of EPS during processing.

29

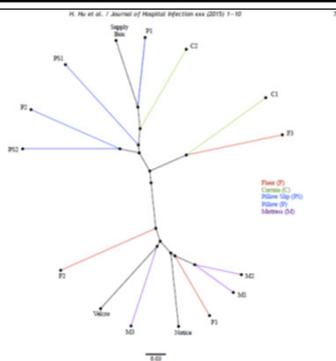
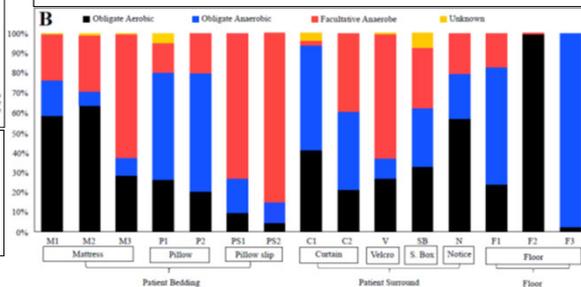


Figure 4. Radial phylogenetic tree showing the relationships of bacteria on different dry surfaces based on the composition of bacteria within the biofilm. Phylogenetic analysis showed that the microorganisms containing similar items were more closely related than the microorganisms containing different items for microorganism groups. Curves (red and purple) and yellow (black). However, the three blue microorganisms (green) were more divergent.

Au plan phylogénétique, Proximité des espèces prélevées sur des surfaces proches, diversité sur les sols

Une surprise : la proportion d'anaérobies strictes (près de 50% des espèces, en bleu) dans ces biofilms de surfaces ouvertes.

Structure de la matrice, rôle du chimiofilm* ?



Hu H, et al., Intensive care unit environmental surfaces are contaminated by multidrug-resistant bacteria in biofilms: combined results of conventional culture, pyrosequencing, scanning electron microscopy, and confocal laser microscopy. Journal of Hospital Infection (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2015.05.016>

*Capeyon O., Carencio P., Maintenir la propreté visuelle avec moins de détergent aux CH d'Antibes Juan-les-Pins et de Cannes. Méthode et concept de chimiofilm, Techniques Hospitalières n°765, Aou*ût-Septembre-Octobre 2017

30

Conclusion pratique

1. « Il est important de ne pas restreindre les réflexions sur l'antibiorésistance uniquement à l'utilisation des antibiotiques. Notamment, l'utilisation immodérée des désinfectants et biocides, y compris par les particuliers, pourrait participer à la sélection croisée des résistances »
In Rapport Carlet

2. L'avenir des produits d'entretien hospitaliers est aux probiotiques, comportant des BG+ environnementaux non pathogènes et producteurs d'enzymes et de tensioactifs biodégradables à faible CMC

Les détergents issus de la **chimie du pétrole** forment des micelles nécessitant de nombreuses molécules car leur pôle hydrophile est petit



Les détergents **biosourcés** forment des micelles nécessitant moins de molécules car leur pôle hydrophile est grand : ils forment leurs micelles à concentration plus faible, et de plus leur biodégradabilité est meilleure du fait de leur origine biologique

