

# L'efflux actif des antibiotiques et la résistance bactérienne : état de la question et implications

## *Active antibiotic efflux: state of the art and implications*

N. Mesaros<sup>1</sup>, F. Van Bambeke<sup>1</sup>, L. Avrain<sup>1</sup>, Y. Glupczynski<sup>2</sup>, R. Vanhoof<sup>3</sup>, P. Plesiat<sup>4</sup>, P.M. Tulkens<sup>1</sup>

**RÉSUMÉ.** L'accroissement des résistances rend la thérapeutique empirique des infections bactériennes de plus en plus difficile. Le mécanisme de résistance par efflux est un de ceux qui contribuent de façon prédominante au déclin des antimicrobiens. L'efflux de substances potentiellement toxiques est, en fait, un moyen de protection quasi universel pour toute cellule, et les antibiotiques ne sont, la plupart du temps, que des substrats opportunistes. Cet article décrit les principaux transporteurs d'efflux d'antibiotiques observés chez quatre bactéries d'intérêt médical (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). L'efflux est souvent responsable d'un bas niveau de résistance et pourrait donc être considéré comme d'importance mineure par le clinicien. Cependant, il peut coopérer avec d'autres mécanismes de résistance, conférant ainsi aux souches correspondantes des niveaux de résistance élevés, faciliter la sélection de mutants résistants de haut niveau et être responsable de la multirésistance de souches cliniques. Cette dernière caractéristique dérive du fait que plusieurs transporteurs ne sont pas spécifiques d'une structure chimique précise, mais reconnaissent de façon générale des familles de molécules sur une base plutôt biophysique (amphiphilie). De plus, les transporteurs sont souvent codés par des éléments génétiques mobiles (favorables à une dissémination rapide des gènes en cause), et leur expression peut être inductible. Il apparaît donc important que ce mécanisme de résistance puisse être mis en évidence par les laboratoires de microbiologie clinique. La présence des transporteurs doit en effet être prise en compte dès maintenant dans les choix thérapeutiques non seulement pour le patient individuel, mais aussi dans le cadre d'une politique antibiotique rationnelle à l'hôpital.

**Mots-clés :** Efflux - Transporteurs - Antibiotiques - *S. aureus* - *S. pneumoniae* - *E. coli* - *P. aeruginosa*.

**ABSTRACT.** The steady increase in bacterial resistance makes the empiric treatment of bacterial infections more and more difficult. Active efflux is now considered as one of the predominant mechanisms that contribute to the decline of antimicrobials. Efflux of potentially toxic substances is, actually, a universal mechanism of protection in every cell, and antibiotics are, most often, opportunistic substrates only. In the present paper, we describe some of the important transport systems responsible for the efflux of major antibiotics in four bacteria of large medical importance (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). Because it usually causes only moderate resistance by itself, efflux could be considered of little importance for the clinician. However, efflux can cooperate with other mechanisms and, thereby, confer higher levels of resistance, can make the process of selection of resistant mutants easier, may be responsible for multiresistance phenotypes in clinical bacterial strains. The latter property results from the fact that most transporters are not very specific of a given chemical structure, but recognise entire families of molecules based on their biophysical properties (amphiphilicity). In addition, transporters are often encoded by mobile genetic elements, which ensure their dissemination among bacterial populations. It is, therefore, important for the clinical microbiology laboratories to detect this mechanism of resistance. The presence of transporters will need to be taken into account for an appropriate choice among potential antibiotics. This is not only important for the individual patient but also for a rational antibiotic policy in the hospital and the community.

**Keywords:** Efflux - Transporters - Antibiotics - *S. aureus* - *S. pneumoniae* - *E. coli* - *P. aeruginosa*.

**D**epuis leur découverte au milieu du siècle passé et jusqu'à il y a quelques années seulement, les antibiotiques ont été considérés comme des médicaments dont l'efficacité clinique n'était quasiment jamais mise

en défaut. Cela n'est plus vrai aujourd'hui, car on a pris pleinement conscience de la capacité des bactéries à développer facilement et rapidement des mécanismes de résistance nombreux et variés.

Les conséquences collectives et individuelles de la résistance bactérienne sont graves, car elle représente une cause croissante d'échecs thérapeutiques, dont la réalité est de plus en plus évidente (1). De plus, elle oblige le prescripteur à utiliser des antibiotiques nouveaux ou à spectre plus large, mais suscep-

<sup>1</sup>Unité de pharmacologie cellulaire et moléculaire, université catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique.

<sup>2</sup>Laboratoire de microbiologie, cliniques universitaires de l'UCL à Mont-Godinne, Yvoir, Belgique.

<sup>3</sup>Unité de recherches sur les antibiotiques, Institut Pasteur, Bruxelles, Belgique.

<sup>4</sup>Laboratoire de bactériologie, hôpital Jean-Minjoz, Besançon.

tibles eux-mêmes d'engendrer d'autres types de résistance (2). Elle incite également le prescripteur à augmenter les doses, afin de faire face aux diminutions de sensibilité observées même dans des infections courantes (3-5), ou encore à l'utilisation d'associations d'antibiotiques de classes différentes (6, 7). Les infections dues aux espèces bactériennes résistantes sont généralement reconnues comme plus sévères, et donc plus difficiles à traiter. Le risque le plus sérieux réside dans le manque d'antibiotique actif, situation encore rare, mais qui n'est plus exceptionnelle et qui exige le recours à des thérapies à risque toxique élevé (8).

On distingue deux situations principales : la *résistance naturelle* (ou intrinsèque) et la *résistance acquise*.

✓ La *résistance naturelle* est celle qui est présente dans toutes les souches de l'espèce considérée. Elle est censée préexister à l'usage des antibiotiques. Elle constitue donc une caractéristique propre à l'espèce et délimite en fait le spectre d'activité des antibiotiques. On parle ici d'*espèces insensibles*<sup>(1)</sup>.

✓ La *résistance acquise* résulte, quant à elle, de l'utilisation des antibiotiques et ne concerne qu'un certain nombre de souches, qui se distinguent ainsi des souches sauvages au sein d'une espèce bactérienne donnée. On parle donc ici de *souches insensibles* (ou, si la résistance est de bas niveau, de souches à sensibilité diminuée).

Les mécanismes de la résistance acquise (*figure 1*) sont de mieux en mieux connus. Ils mettent en jeu quatre grands types de stratégies qui sont toutes sous contrôle génétique, à savoir la stratégie offensive (la bactérie produit une enzyme capable d'inactiver l'antibiotique), la stratégie d'évitement (une modification de la cible de l'antibiotique rend ce dernier inefficace), la stratégie de contournement (l'antibiotique atteint sa cible et interagit avec elle, mais la bactérie est capable d'utiliser d'autres voies métaboliques pour suppléer au manque d'activité de la cible primaire), et la stratégie de la protection physique, qui consiste soit à empêcher l'entrée de l'antibiotique dans la bactérie (impermeabilisation membranaire), soit à l'expulser (efflux actif).

C'est ce mécanisme d'efflux actif, moins bien connu, mais sans doute très important, qui fera l'objet de cet article. Nous nous concentrerons sur quatre bactéries d'intérêt clinique indiscutable, à savoir *Staphylococcus aureus*, responsable d'un grand nombre d'infections cutanées et des tissus mous, et de près de 30 % des infections en soins intensifs en Europe (9) ; *Strepto-*

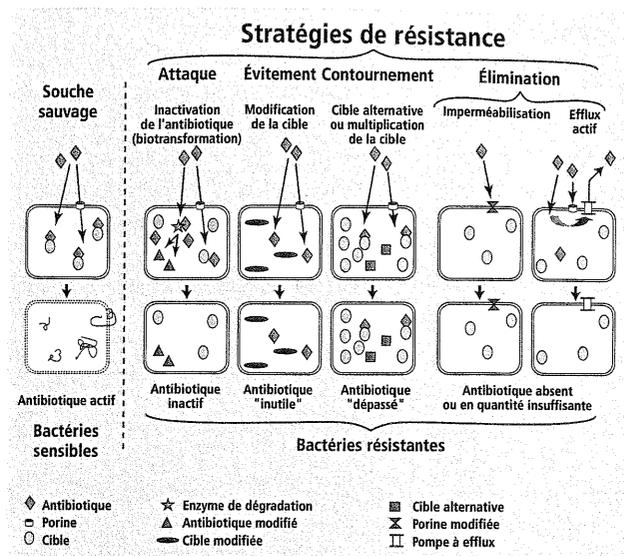


Figure 1. Principales stratégies mises en place par les bactéries pour résister à l'action des antibiotiques. Une même bactérie peut exprimer simultanément plusieurs de ces mécanismes, lesquels peuvent aussi se retrouver dans plusieurs espèces bactériennes différentes.

*coccus pneumoniae*, agent principal des pneumonies communautaires et des infections respiratoires en général, mais également impliqué dans des infections graves comme la méningite ; *Escherichia coli*, responsable de la majorité des infections urinaires communautaires et, pour certaines espèces, d'infections intestinales ; et enfin *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie présente dans l'environnement, mais qui devient redoutable lorsqu'elle infecte des sujets aux défenses diminuées, et qui serait responsable de plus de 10 % des infections nosocomiales.

#### DÉCOUVERTE DES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE PAR EFFLUX

Les travaux de S. Levy sur la résistance aux tétracyclines ont mis en évidence pour la première fois la capacité de *E. coli* à "effluer" ces antibiotiques (10). Au même moment, un mécanisme d'efflux était découvert dans des cellules leucémiques devenues résistantes aux anthracyclines (11). Ce mécanisme devait rapidement apparaître comme une cause importante d'échecs thérapeutiques en oncologie, car il peut affecter des agents anticancéreux très différents sur le plan de la structure chimique (12). Au-delà des médicaments, l'efflux est aussi observé pour d'autres substances dont les seuls points communs sont d'être, d'une part, potentiellement toxiques pour la cellule et, d'autre part, capables de passer au travers des mem-

<sup>(1)</sup> La plupart des antibiotiques étant des substances naturelles (ou développées à partir de substances naturelles actives), il est probable qu'une partie de la résistance naturelle soit en fait une adaptation des bactéries à la présence de ces substances dans l'environnement avant et indépendamment de toute intervention humaine.

branes cellulaires. Un progrès fondamental a été accompli lorsqu'on a compris que l'efflux constituait en fait un mécanisme très général participant à l'homéostasie cellulaire en expulsant les agents néfastes. Cette fonction d'efflux se révèle très importante, car l'analyse génomique montre que près de 10 % des protéines d'une cellule possèdent les propriétés nécessaires pour en faire des transporteurs.

**CLASSIFICATION DES TRANSPORTEURS ET MÉCANISME D'EFFLUX**

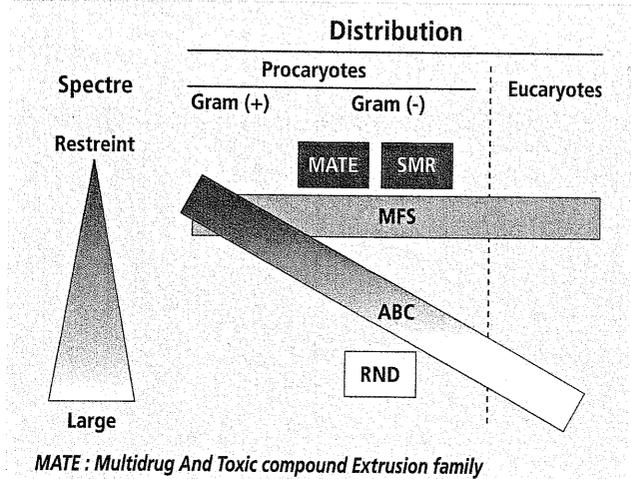
Les transporteurs reconnaissent de façon primaire des substrats physiologiques tels que les nutriments ou des produits de catabolisme (13), et leur activité de transport des médicaments est donc le plus souvent opportuniste. Si l'on se limite aux transporteurs capables d'effluer les antibiotiques les plus importants (14), les pompes à efflux peuvent être regroupées en cinq familles (tableau I).

**Tableau I. Principales classes de pompes à efflux reconnues capables de transporter les antibiotiques au niveau des bactéries. Chaque classe contient un nombre élevé de transporteurs différents, dont les propriétés et la distribution dans le monde bactérien peuvent varier considérablement.**

Famille (dénomination*)	Acronyme	Source d'énergie
ATP-Binding Cassette	ABC	ATP
Major Facilitator Superfamily	MFS	
Resistance-Nodulation-cell Division	RND	Gradients d'ions
Small Multidrug Resistance	SMR	

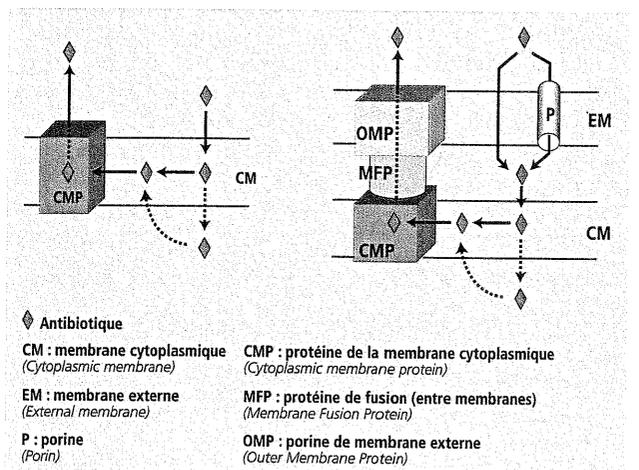
\* Les dénominations sont celles données lors de la découverte des transporteurs, et correspondent souvent à des éléments contingents liés à cette découverte, ce qui explique qu'ils ne soient pas nécessairement en rapport avec les fonctions établies sur la base des travaux ultérieurs.

Si certains transporteurs ne reconnaissent qu'une ou deux classes d'antibiotiques, d'autres peuvent expulser des antibiotiques appartenant à des classes très différentes. Certaines familles présentent un continuum entre procaryotes et eucaryotes, ce qui laisse supposer qu'il s'agit de protéines codées par des gènes très anciens et conservés tout au long de l'évolution. On pense donc que leur rôle est très important pour la survie de toute cellule. La figure 2 montre de façon combinée le spectre de reconnaissance des antibiotiques par les pompes à efflux ainsi que leur distribution entre organismes à Gram positif et à Gram négatif d'une part et entre procaryotes et eucaryotes d'autre part. Certains transporteurs sont restreints à un groupe de bactéries (par exemple les bactéries à Gram négatif en cas de Resistance-Nodulation-cell Division [RND]), car ils sont davantage adaptés à la structure générale de ces organismes (figure 3). On voit aussi que certains transporteurs ont un spectre étroit, tandis que d'autres sont capables de transporter des antibiotiques de structures très différentes (14).



**Figure 2. Distribution (coordonnée horizontale) et spectre d'activité (coordonnée verticale) des principaux transporteurs d'antibiotiques indiqués aux tableaux I, II et III (se référer au tableau I pour la signification des acronymes).**

La topologie des transporteurs (c'est-à-dire la façon dont la ou les protéine[s] se dispose[nt] au travers de la membrane) est présentée dans la figure 3. Les transporteurs présents chez les bactéries à Gram positif ne sont constitués que d'une seule protéine (Cytoplasmic Membrane Protein [CMP]), directement responsable de l'efflux vers l'espace situé sous le peptidoglycane, à partir duquel les molécules peuvent diffuser aisément



**Figure 3. Organisation (topologie) générale des transporteurs d'antibiotiques dans les organismes à Gram (+) [à gauche] et à Gram (-) [à droite]. Les abréviations sont données en anglais sur la figure afin de faciliter la recherche des informations dans les publications internationales. Les flèches décrivent le chemin probable des antibiotiques sujets à efflux. On pense qu'une fraction importante est captée au moment du passage de la molécule au travers de la membrane cytoplasmique, mais une capture à partir du cytoplasme est aussi possible.**

.../...

.../...

vers l'extérieur. En revanche, les transporteurs présents chez les bactéries à Gram négatif sont généralement plus complexes, étant donné que ces organismes possèdent deux membranes, l'une (appelée membrane interne) séparant le cytoplasme de l'espace situé sous le peptidoglycane, et une seconde (appelée membrane externe) entourant le peptidoglycane et délimitant un compartiment intermembranaire appelé périplasma. La CMP, responsable de l'efflux, est donc associée à deux autres protéines, dont la première (*Outer Membrane Protein* [OMP]) est située au niveau de la membrane externe, tandis que la seconde (*Membrane Fusion Protein* [MFP]) assure la jonction de la CMP à l'OMP. Ces trois protéines s'assemblent pour permettre le transport à travers les deux membranes.

La *figure 3* montre également que les antibiotiques sont captés par la CMP de façon préférentielle à partir de la membrane elle-même et non pas à partir du cytosol. Ce phénomène inattendu explique en fait très bien que les pompes à efflux soient particulièrement efficaces vis-à-vis des molécules amphiphiles (c'est-à-dire capables de se dissoudre à la fois dans des milieux aqueux [hydrophilie] et les membranes [lipophilie]). Il y a donc un véritable dilemme dans le cadre de la sélection et du développement de nouvelles molécules antibactériennes, car un caractère amphiphile est souvent essentiel pour obtenir une bonne biodisponibilité dans l'organisme. Celle-ci est dès lors souvent associée à la capacité de reconnaissance par les pompes à efflux.

ÉTUDE DES PRINCIPALES POMPES À EFFLUX  
CHEZ *S. AUREUS*, *S. PNEUMONIAE*, *E. COLI* ET *P. AERUGINOSA*

Les *tableaux II et III* reprennent sous une forme synthétique les notions essentielles concernant ces transporteurs. Pour la facilité de la lecture, nous avons volontairement limité les informations à celles concernant les antibiotiques d'usage clinique courant, mais il faut souligner que bien d'autres antibiotiques (le chloramphénicol, l'acide fusidique ou la rifampicine, par exemple) sont des substrats fréquents des pompes à efflux (14, 15).

**S. aureus**

Le transporteur le plus connu est NorA, décrit dès les années 1990 (16). Il est responsable de l'efflux des fluoroquinolones. Le génome de *S. aureus* code pour au moins dix autres protéines homologues à NorA, et pour lesquelles une fonction de transport est probable (17). Cela laisse supposer que d'autres transporteurs encore non identifiés pourraient également être produits par la bactérie. Le transporteur MsrA, membre de la famille ABC, est responsable de la résistance aux macrolides. Identifié pour la première fois chez *Staphylococcus epidermidis* (18), MsrA est responsable de plus de 10 % des résistances aux macrolides dans des isolats cliniques de *S. aureus* sensibles à la méticilline récoltés au niveau européen (19). MdeA est un système d'efflux décrit tout récemment chez *S. aureus*, qui recon-

.../...

Tableau II. Transporteurs d'antibiotiques chez *S. aureus* et *S. pneumoniae*.

Organisme	Famille <sup>(1)</sup>	Système d'efflux	Localisation du gène <sup>(2)</sup>	Antibiotique						
				Bêta-lactamines	Aminoglycosides	Fluoroquinolones	Macrolides	Tétracyclines	Triméthoprime	Sulfamides
<i>S. aureus</i>	ABC	MsrA	C				+			
		QacA	P							+ <sup>(3)</sup>
	MFS	MdeA			+					
<i>S. pneumoniae</i>	MFS	NorA	C			+				
		Tet K-L	P					+		
		MefA	T				+			
		MefE	T				+			
<i>S. pneumoniae</i>	MFS	PmrA				+				
		Tet K-L	P					+		

<sup>(1)</sup> ABC : ATP-Binding Cassette superfamily ; MFS : Major Facilitator Superfamily.

<sup>(2)</sup> C : chromosome, P : plasmide, T : transposon.

<sup>(3)</sup> Composés quaternaires d'ammonium : chlorhexidine, bromure de cétrimonium, chlorure de benzalkonium.

Tableau III. Transporteurs d'antibiotiques chez *E. coli* et *P. aeruginosa*.

Organisme	Famille <sup>(1)</sup>	Système d'efflux	Localisation du gène <sup>(2)</sup>	Antibiotique						Antiseptiques <sup>(3)</sup>	
				Bêta-lactamines	Aminoglycosides	Fluoroquinolones	Macrolides	Tétracyclines	Triméthoprime		Sulfamides
<i>E. coli</i>	ABC	MacAB-TolC	C				+				
	MATE	YdhE				+			+		
	MFS	Bcr							+		
		Dep							+		+
		ErmAB-TolC					+		+		
		Fsr								+	
		MdfA		C					+		
		SetA								+	
		Tet A-E		P		+			+		
	Ycel										
YebQ					+				+		
RND	AcrAB-TolC			+		+	+	+	+		
	AcrAD-TolC		C		+						
	AcrEF-TolC			+		+	+	+	+		
	YegN					+					
SMR	ErmE						+	+		+	
	SugE									+	
<i>P. aeruginosa</i>	MFS	Tet A, C, E	P					+			
	RND	MexAB-OprM	C	+		+	+	+	+	+	
		MexCD-OprJ			+		+	+	+		
		MexEF-OprN					+		+		
		MexJK-OprM						+	+		
		MexXY-OprM		C		+		+	+		

<sup>(1)</sup> ABC : ATP-Binding Cassette superfamily ; MFS : Major Facilitator Superfamily ; MATE : Multidrug And Toxic compound Extrusion family ; SMR : Small Multidrug Resistance family ; RND : Resistance-Nodulation-cell Division family.  
<sup>(2)</sup> C : chromosome, P : plasmide.  
<sup>(3)</sup> Composés quaternaires d'ammonium : chlorhexidine, bromure de cétrimonium, chlorure de benzalkonium.

.../...

naît les aminoglycosides (20). Fait assez inquiétant, on a également découvert des transporteurs (QacA) capables d'effluer les antiseptiques de type ammonium quaternaire, ce qui illustre bien l'hypothèse selon laquelle les bactéries sont capables de se protéger contre une très grande variété de molécules toxiques (21).

### *S. pneumoniae*

Identifiée en 1999, la pompe à efflux PmrA est un homologue du transporteur NorA de *S. aureus* (24 % d'identité au niveau génomique) et est également capable de transporter les fluoroquinolones (22). Sa prévalence semble nulle chez l'enfant en France (23), mais cela est sans doute simplement lié au fait que ces antibiotiques ne sont normalement pas utilisés dans cette population [des valeurs atteignant 16 % sont observées aux États-Unis dans la population générale, où la

lévofloxacine est largement utilisée (24)]. Le système d'efflux MefA, identifié en 1996 chez *Streptococcus pyogenes* (25) et son homologue MefE (95 % d'identité au niveau génomique), découvert par la suite chez *S. pneumoniae* (26), peuvent être associés à la résistance aux macrolides à 14 et 15 atomes. Très répandus en Amérique du Nord (27), leur prévalence respective, en Europe, varie d'un pays à l'autre (28-30).

### *E. coli*

L'analyse du génome de *E. coli* a montré la présence de gènes codant pour au moins 37 transporteurs déjà caractérisés ou potentiels (31). Le plus connu et le plus étudié est le transporteur AcrAB-TolC, un membre de la famille RND décrit pour la première fois en 1978 (32). Ce système est capable de transporter les antibiotiques d'au moins cinq classes

majeures. Cette faible spécificité constitue un avantage pour la bactérie dans la mesure où elle peut ainsi faire face à des situations très différentes. AcrAB-TolC est en effet un transporteur des sels biliaires, dont l'expression inductible est nécessaire à la survie de *E. coli* dans le milieu intestinal. Cela illustre l'hypothèse selon laquelle les antibiotiques ne sont que des substrats opportunistes de systèmes de transport indispensables à la survie des bactéries dans leur environnement naturel. La surproduction stable de cette pompe serait très fréquente chez les souches cliniques hautement résistantes aux fluoroquinolones [9 sur 10 dans une étude italienne (33) et 19 sur 30 dans une étude chinoise (34)], et concomitante de mutations dans les cibles de ces antibiotiques. Une deuxième catégorie importante de transporteurs chez *E. coli* est représentée par les protéines Tet A-E responsables de l'efflux des tétracyclines depuis le cytosol vers le périplasma (35). Les protéines Tet représentent en fait un des mécanismes majeurs de résistance aux tétracyclines pour l'ensemble des bactéries à Gram négatif (15).

#### *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* est un organisme naturellement résistant à un grand nombre d'antibiotiques. On a longtemps associé cette propriété à la faible perméabilité membranaire de *P. aeruginosa* aux molécules étudiées. Mais la découverte de la première pompe à efflux constitutive chez cet organisme (MexAB-OprM) a complètement modifié cette représentation (36). En effet, on a pu montrer que la résistance naturelle de *P. aeruginosa* résulte en grande partie de l'expression de systèmes d'efflux, car l'inactivation des gènes correspondants rend les souches sauvages de *P. aeruginosa* sensibles à la plupart des antibiotiques courants (37). Dans le même ordre d'idée, on a montré que la résistance adaptative de *P. aeruginosa* aux aminoglycosides (sélection d'une sous-population à caractère de résistance instable) pourrait en fait résulter de la surexpression transitoire du transporteur MexXY (38). La contribution des pompes à efflux dans la résistance acquise des souches cliniques reste difficile à apprécier en raison de la lourdeur des techniques d'investigation (voir plus loin). Toutefois, cette contribution peut être estimée par défaut. En effet, différentes études, anglaises (39, 40), italienne (41) et française (42), ont montré que la résistance non enzymatique (dite "intrinsèque") aux bêta-lactamines (impipénème excepté) chez *P. aeruginosa* était au moins aussi fréquente que la production de bêta-lactamases. Ce type de résistance "intrinsèque" est, en réalité, associé à la surproduction du système MexAB-OprM dans de nombreuses souches (42, 43). Par ailleurs, l'utilisation d'un inhibiteur d'efflux (MC-04,124) a confirmé la forte prévalence des mutants cliniques résistants par efflux actif, notamment aux fluoroquinolones [plus de 60 % chez les souches résistantes à la lévofloxacine] (44).

#### IMPACT DE L'EFFLUX SUR LA RÉSISTANCE CLINIQUE AUX ANTIBIOTIQUES

La signification clinique de la résistance aux antibiotiques par un mécanisme d'efflux a été initialement l'objet de controverses, car les premières études ne montraient qu'une légère augmentation des CMI (37). L'antibiogramme ne présentait donc habituellement pas de changement majeur vis-à-vis des principaux antibiotiques en usage clinique, et les souches restaient le plus souvent cataloguées comme sensibles. Cependant, les éléments suivants se sont avérés importants à prendre en compte dans le cadre d'une politique antibiotique rationnelle.

- ✓ La plupart des transporteurs peuvent être surproduits sous l'effet de mutations. Ce phénomène n'est pas facilement détectable par les techniques classiques d'antibiogramme, car il se traduit généralement par une faible augmentation des CMI. Cela peut entraîner une réelle sous-estimation des taux de résistance. Si la mutation affecte un transporteur à large spectre, elle peut conférer une multirésistance atteignant de nombreuses classes d'antibiotiques souvent non apparentées (par exemple, l'exposition de *P. aeruginosa* à la ciprofloxacine peut sélectionner des mutants surproduisant le transporteur MexAB-OprM, ce qui se traduira par un efflux et une diminution de sensibilité vis-à-vis de la majorité des bêta-lactamines utilisées en clinique, y compris les antibiotiques les plus actifs et au spectre le plus large, tels le méropénème ou les céphalosporines de troisième et quatrième génération (45). Le clinicien pourra être surpris par l'apparition de ces résistances inattendues. Ce phénomène peut être particulièrement important en cas d'exposition à des doses d'antibiotique infrathérapeutiques.
- ✓ Les mécanismes d'efflux peuvent coopérer avec d'autres mécanismes pour déterminer un haut niveau de résistance. Par exemple, la résistance de *P. aeruginosa* aux bêta-lactamines résulte le plus souvent de la combinaison d'une faible perméabilité, de la présence (et de la surexpression) du transporteur MexAB-OprM et de l'activité d'une bêta-lactamase de type AmpC (46).
- ✓ L'expression concomitante de plusieurs pompes à efflux reconnaissant un même antibiotique peut entraîner une résistance de haut niveau (47), et la coexpression de plusieurs pompes entraîne une multirésistance (48).
- ✓ L'activité des pompes à efflux augmente le risque de sélection de mutants résistants. En effet, la diminution de la concentration intrabactérienne qu'elles induisent favorise la survie des souches à sensibilité diminuée, ce qui entraîne à moyen terme une hausse généralisée des CMI. Cela pourrait expliquer l'émergence rapide de populations de bactéries résistantes lorsque les antibiotiques sont utilisés à doses insuffisantes. A contrario, on a pu montrer que l'inactivation des pompes à efflux chez *P. aeruginosa* non seulement accroît la sensibilité à certains antibiotiques (par exemple : la lévofloxacine), mais aussi diminue la fréquence de sélection des mutants résistants (37).

✓ Enfin, il faut rappeler que les gènes codant pour des pompes à efflux sont parfois situés sur des éléments génétiques mobiles et transférables tels les plasmides ou les transposons. Ces éléments peuvent être facilement transférés d'une bactérie résistante à une bactérie sensible, ce qui entraînera la dissémination de la résistance non seulement au sein d'une espèce, mais aussi entre espèces bactériennes différentes.

Dans une perspective plus optimiste, il faut cependant faire remarquer que toutes les molécules appartenant à une classe d'antibiotiques donnée ne sont pas affectées de la même manière par les systèmes de pompes à efflux. Ainsi, les kétolides (actuellement représentés par la seule télithromycine), les fluoroquinolones lipophiles (représentées essentiellement par la moxifloxacine) ou encore l'imipénème sont nettement moins sujets à efflux que les autres molécules de leurs classes pharmacologiques respectives [comme les macrolides à 14 ou à 15 atomes de carbone, les fluoroquinolones hydrophiles (ciprofloxacine, norfloxacine, lévofloxacine) ou le méropénème].

#### IMPLICATIONS POUR LE LABORATOIRE, LE CLINICIEN ET LES AUTORITÉS DE SANTÉ PUBLIQUE

Les conséquences et implications cliniques des mécanismes de résistance par les pompes à efflux sont encore mal connues, mais elles ne sont probablement pas bénignes. Elles devront donc faire l'objet d'études rigoureuses et approfondies. La résistance de bas niveau résultant de la surexpression des pompes à efflux est souvent ignorée, et il est probable que, au sein de certaines espèces (par exemple *P. aeruginosa*), un nombre non négligeable de souches déclarées sensibles par les méthodes conventionnelles soient en réalité des organismes en voie d'acquisition de résistances de haut niveau (49).

D'une façon générale, il est très souhaitable que le prescripteur soit informé des distributions des CMI des pathogènes attendus dans les pathologies infectieuses les plus courantes. La catégorisation qualitative des résultats de l'antibiogramme en "sensible/intermédiaire/résistant" est insuffisante, car elle ne permet pas de connaître le niveau exact de sensibilité du pathogène responsable. Elle occulte, en fait, des différences parfois importantes entre germes dits "sensibles" (par exemple, germes sauvages très sensibles et germes de sensibilité diminuée, mais encore catégorisés comme "sensibles"). Elle empêche dès lors d'adopter une attitude thérapeutique optimale. Il est également important que l'attention du prescripteur soit attirée sur les différences de susceptibilité aux phénomènes d'efflux parmi les diverses molécules disponibles au sein de la classe pharmacologique considérée. Inversement, il doit être mis en garde contre des molécules pour lesquelles une résistance croisée peut être attendue (dans la classe considérée, mais surtout au-delà de cette

classe). Il apparaît donc essentiel pour le laboratoire de mettre en place les moyens de détecter la présence des pompes à efflux. A minima, cela peut se faire par une détermination plus systématique des CMI, ou encore par la pratique de l'antibiogramme interprété (qui consiste à rechercher systématiquement la sensibilité des germes importants vis-à-vis d'antibiotiques qui sont des substrats privilégiés des pompes à efflux, et cela même si ces antibiotiques ne sont pas nécessairement en usage clinique dans l'hôpital). La mise en évidence phénotypique et génotypique des mécanismes de résistance par efflux par l'utilisation de substrats inhibiteurs de pompes à efflux ou par des méthodes de biologie moléculaire permettant de quantifier le niveau d'expression d'un gène [QC-RT-PCR (*Quantitative Competitive-Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) ou *real-time-PCR*], pourrait aussi, à l'avenir, s'avérer utile.

En termes de santé publique, il serait utile d'introduire au niveau des laboratoires de référence les procédures permettant une surveillance systématique de la fréquence et de l'impact des pompes à efflux, en particulier pour les germes isolés à partir des groupes à risque. Cela permettrait non seulement de préciser l'importance du phénomène, mais surtout d'anticiper les éventuelles conséquences thérapeutiques (en termes de choix d'antibiotique ou de posologies à appliquer). Associé aux autres outils dont disposent les autorités en charge de la santé publique pour améliorer la qualité de la prescription, cet effort permettrait peut-être de définir une vraie politique antibiotique rationnelle et, partant, de diminuer les risques, tant pour le patient à court terme que pour la population générale à moyen et long terme.

Enfin, le développement d'une résistance par efflux vis-à-vis des désinfectants nous paraît un élément particulièrement inquiétant au niveau de l'hôpital (21). Ce phénomène, qui découle directement de la capacité des bactéries à s'adapter de façon large à une très grande variété d'environnements, devra sans aucun doute faire, à l'avenir, l'objet d'une surveillance accrue. ■

#### R É F É R E N C E S B I B L I O G R A P H I Q U E S

1. Lonks JR. What is the clinical impact of macrolide resistance? *Curr Infect Dis Rep* 2004;6:7-12.
2. Unal S, Masterton R, Goossens H. Bacteraemia in Europe-Antimicrobial susceptibility data from the MYSTIC Surveillance Programme. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:155-63.
3. Arrieta A, Singh J. Management of recurrent and persistent acute otitis media: new options with familiar antibiotics. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:S115-S124.
4. Piglansky L, Leibovitz E, Raiz S et al. Bacteriologic and clinical efficacy of high dose amoxicillin for therapy of acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:405-13.
5. Jacobs MR. Building in efficacy: developing solutions to combat drug-resistant *S. pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(suppl.2):18-27.
6. Feldman C. Clinical relevance of antimicrobial resistance in the management of pneumococcal community-acquired pneumonia. *J Lab Clin Med* 2004;143:269-83.

7. Beaucaire G, Nicolas MH, Martin C et al. Comparative study of combined cefepime-amikacin versus ceftazidime combined with amikacin in the treatment of nosocomial pneumonias in ventilated patients. Multicenter Group Study. *Ann Fr Anesth Reanim* 1999;18:186-95.
8. Dellamonica P, Roger PM, Mousnier A, Collomb R, Bernard E, Fosse T. How to organise antibiotic prescription. *Int J Antimicrob Agents* 2001;18:299-303.
9. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 1995;274:639-44.
10. Levy SB, McMurry L. Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. *Nature* 1978;276:90-2.
11. Inaba M, Kobayashi H, Sakurai Y, Johnson RK. Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388. *Leukemia. Cancer Res* 1979;39:2200-3.
12. Gerlach JH, Kartner N, Bell DR, Ling V. Multidrug resistance. *Cancer Surv* 1986;5:25-46.
13. Paulsen IT, Park JH, Choi PS, Saier MH, Jr. A family of Gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1997;156:1-8.
14. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens P M. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol* 2000;60:457-70.
15. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004;64:159-204.
16. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *NorA* gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol* 1990; 172: 6942-9.
17. Kaatz GW, Seo SM, O'Brien L, Wahiduzzaman M, Foster T J. Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from *NorA* in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1404-6.
18. Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, Wootton JC. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol* 1990;4:1207-14.
19. Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A et al. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:891-4.
20. Huang J, O'Toole PW, Shen W et al. Novel chromosomally encoded multidrug efflux transporter *MdeA* in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:909-17.
21. Russell AD. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 2002:1215-1355.
22. Gill MJ, Brenwald N P, Wise R. Identification of an efflux pump gene, *PmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:187-9.
23. Decousser JW, Ovetchkine P, Collignon A et al. Multicentre study of the molecular epidemiology, serotypes and antimicrobial susceptibility patterns of invasive *Streptococcus pneumoniae* invasive isolated from children in the Ile-de-France area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:27-33.
24. Pletz MW, McGee L, Jorgensen J et al. Levofloxacin-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in the United States: evidence for clonal spread and the impact of conjugate pneumococcal vaccine. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3491-7.
25. Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *MefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 1996;22:867-79.
26. Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M et al. *MefE* is necessary for the erythromycin-resistant *M* phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2251-5.
27. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Morris L, Buckridge S, Felmingham D. Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both *Erm(B)*- and *Mef(A)*-mediated macrolide resistance. *J Clin Microbiol* 2004;42: 764-8.
28. Marchandin H, Jean-Pierre H, Jumas-Bilak E et al. Distribution of macrolide resistance genes *Erm(B)* and *Mef(A)* among 160 penicillin-intermediate clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Southern France. *Pathol Biol* 2001;49:522-7.
29. Pihlajamaki M, Kaijalainen T, Huovinen P, Jalava J. Rapid increase in macrolide resistance among penicillin non-susceptible pneumococci in Finland, 1996-2000. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:785-92.
30. Montanari MP, Mingoia M, Cochetti I, Valardo PE. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant pneumococci in Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41:428-31.
31. Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001;183:5803-12.
32. Nakamura H, Hachiya N, Tojo T. Second acriflavine sensitivity mutation, *AcrB*, in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1978;134:1184-7.
33. Mazzariol A, Tokue Y, Kanegawa TM, Cornaglia G, Nikaido H. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein *AcrA*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3441-3.
34. Wang H, Dzink-Fox J L, Chen M, Levy S B. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: Role of *AcrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1515-21.
35. Thanassi DG, Suh G S, Nikaido H. Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995;177:998-1007.
36. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 1994;264:382-8.
37. Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K et al. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1340-6.
38. Hocquet D, Vogne C, El Garch F et al. *MexXY-OprM* efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1371-5.
39. Williams RJ, Livermore DM, Lindridge MA, Said AA, Williams JD. Mechanisms of beta-lactam resistance in british isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 1984;17:283-93.
40. Chen HY, Yuan M, Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J Med Microbiol* 1995;43:300-9.
41. Bonfiglio G, Laksai Y, Franchino L, Amicosante G, Nicoletti G. Mechanisms of beta-lactam resistance amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolated in an Italian survey. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:697-702.
42. Cavallo JD, Plesiat P, Couetdic G, Leblanc F, Fabre R. Mechanisms of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of *OprM*-overproducing strains in a French multicentre study 1997. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:1039-43.
43. Ziha-Zarifi I, Llanes C, Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system *MexA-MexB-OprM*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:287-91.
44. Kriengkauykiat J, Porter E, Lomovskaya O, Wong-Beringer A. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:565-70.
45. Le TI, Couetdic G, Clermont O, Brahimi N, Plesiat P, Bingen E. In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:553-5.
46. Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:964-71.
47. Lee A, Mao W, Warren MS et al. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *J Bacteriol* 2000;182:3142-50.
48. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plesiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing *MexAB-OprM* and *MexXY* efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;8:1797-802.
49. Baquero F. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resist Updat* 2001;4:93-105.