

L'EFFLUX DES ANTIBIOTIQUES: UN MÉCANISME UBIQUITAIRE CONDUISANT À LA RÉSISTANCE. ÉTAT DE LA QUESTION ET IMPLICATIONS MICROBIOLOGIQUES ET CLINIQUES

N. MESAROS ¹,
F. VAN BAMBEKE ¹,
Y. GLUPCZYNSKI ²,
R. VANHOOF ³,
P. M. TULKENS ¹

Mots-clefs : efflux, résistance, antibiotiques, *S. aureus*, *S. pneumoniae*,
E. coli, *P. aeruginosa*

RÉSUMÉ

La résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène observé vis-à-vis de toutes les molécules dont nous disposons aujourd'hui. Outre de nombreux mécanismes spécifiques, dont certains sont décrits depuis de nombreuses années, on a observé que les bactéries sont capables d'expulser les antibiotiques, ce qui engendre l'apparition d'un phénotype de résistance de bas niveau. L'importance du phénomène en clinique découle du fait que ce type de résistance (i) peut affecter simultanément plusieurs classes d'antibiotiques structurellement et pharmacologiquement différents et même des antiseptiques ; (ii) peut conduire à des résistances de haut niveau lors de l'expression simultanée de plusieurs pompes agissant sur une même classe d'antibiotiques ; (iii) peut coopérer avec les autres mécanismes de résistance ; (iv) est souvent inductible, rendant les souches moins sensibles après l'initiation d'un traitement ; (v) est rarement diagnostiqué en tant que tel en microbiologie clinique conventionnelle. L'article examine de façon plus approfondie les mécanismes d'efflux observés dans quatre pathogènes majeurs (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) et examine les conséquences de cet état de fait pour le clinicien et les autorités de Santé publique.

Dr Narcisa Mesaros
Unité de pharmacologie cellulaire
et moléculaire
UCL 7370 avenue E. Mounier 73
1200 Bruxelles
E-mail : narcisa.mesaros@facm.ucl.ac.be

¹ Unité de pharmacologie cellulaire et moléculaire,
Université catholique de Louvain, Bruxelles

² Laboratoire de microbiologie,
Cliniques universitaires UCL Mont-Godinne, Yvoir

³ Unité de recherches sur les antibiotiques,
Institut Pasteur, Bruxelles

INTRODUCTION

Depuis leur découverte au milieu du siècle passé et jusqu'il y a quelques années seulement, les antibiotiques ont été considérés comme des médicaments dont l'efficacité clinique n'était presque jamais mise en doute. Ceci 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 efforts combinés des programmes de l'Industrie pharmaceutique¹ et d'institutions officielles nationales (comme, en Belgique, les Centres nationaux des pneumocoques ou des staphylocoques) ou supranationales (tel l'EARSS [European Antimicrobial Resistance Surveillance System]) montrent, indiscutablement, une augmentation constante de la résistance vis-à-vis d'un grand nombre d'antibiotiques d'usage clinique courant dans la plupart des pays². Longtemps limitée aux isolats hospitaliers (1-3), la résistance est maintenant bien présente en médecine ambulatoire (4-7).

La **résistance biologique** d'une espèce bactérienne aux antibiotiques se définit en examinant la distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des populations considérées. On parlera de résistance quand ces CMI sont augmentées de façon mesurable et constante par rapport à une population sauvage³. La **résistance pharmacologique** se définit par une valeur de CMI trop élevée pour permettre un traitement efficace par un antibiotique donné, tenant compte de sa posologie. Ceci conduit à la définition des 'points critiques' (breakpoints) fixant une limite de sensibilité des organismes d'intérêt définie par des organisations nationales ou internationales⁴.

L'origine de la montée des résistances est probablement multifactorielle. En premier lieu, il faut rappeler que les espèces vivantes sont caractérisées par une grande capacité d'adaptation aux changements d'environnement grâce aux processus de mutation et/ou d'acquisition de gènes exo-

gènes suivis d'un processus de sélection. Les bactéries illustrent particulièrement bien cette capacité car les mutations y sont fréquentes, la transmission de matériel génétique relativement aisée, et la sélection rapide, vu leur grande capacité de multiplication. En tant que population, elles ont donc un potentiel élevé de résistance vis-à-vis de tout produit destiné à les détruire. Il existe aujourd'hui un large consensus pour constater que fréquence de résistances et niveau d'usage des antibiotiques sont largement liés (8), et on ne connaît pas de classe d'antibiotiques vis-à-vis de laquelle il ne soit pas possible d'obtenir des souches résistantes.

A ces éléments fondamentaux s'en ajoutent d'autres liés au comportement humain (concentration des populations, augmentation des déplacements) ou médical (utilisation de techniques invasives, traitements immunosuppresseurs). Enfin, il existe une demande importante d'antibiotiques pour des affections qui ne les justifient pas (9, 10), ce qui augmente de façon générale la pression de sélection. Ce dernier concept a longtemps reposé sur des modélisations (11), mais a trouvé ces dernières années de nombreuses démonstrations expérimentales (12, 13).

La résistance bactérienne représente une cause croissante d'échecs thérapeutiques (14-17) et oblige le prescripteur à l'utilisation d'antibiotiques nouveaux, mais le risque le plus sérieux à moyen et long terme est le manque d'antibiotique actif.

MODES DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

On distingue deux grandes situations, à savoir la *résistance naturelle* (ou intrinsèque) d'une part et la *résistance acquise* d'autre part. 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 antibio-

¹ Plusieurs réseaux au noms évocateurs tels Alexander (allusion claire à A. Fleming, et lancé par SmithKlineBeecham), MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection, organisé par AstraZeneca), PROTEKT (Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin, lancé par Aventis), Libra (nom évoquant l'équilibre de la balance, et coordonné par Bayer ...).

² Avec, cependant, certaines exceptions bien connues comme les Pays-Bas ou le Danemark, ce qui incite fortement à réfléchir sur l'impact des politiques nationales dans ce cadre.

³ L'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST; <http://www.eschmid.org> et cliquer sur EUCAST) tente de définir ce qu'est une population sauvage. La meilleure définition semble être celle d'une population de bactéries homogènes du point de vue de leur sensibilité (présentant une distribution gaussienne de leurs CMI exprimées en unités logarithmiques); l'apparition d'une bimodalité ou de distributions asymétriques indique la présence, dans une partie de la population, d'un ou plusieurs mécanismes de résistance absents dans la population de base.

⁴ Les plus connues sont le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; <http://www.nccls.org>; sera renommé Clinical and Laboratory Standards Institute à partir du 1 janvier 2005) aux États-Unis, l'EUCAST (voir note 3) en Europe, et les organismes français (Société française de microbiologie [SFM; <http://www.sfm.asso.fr>), britanniques (British Society of Antimicrobial Chemotherapy [BSAC; <http://www.bsac.org.uk>]) et allemands (Deutsche Institut für Normung [DIN; <http://www.din.de>]) correspondants.

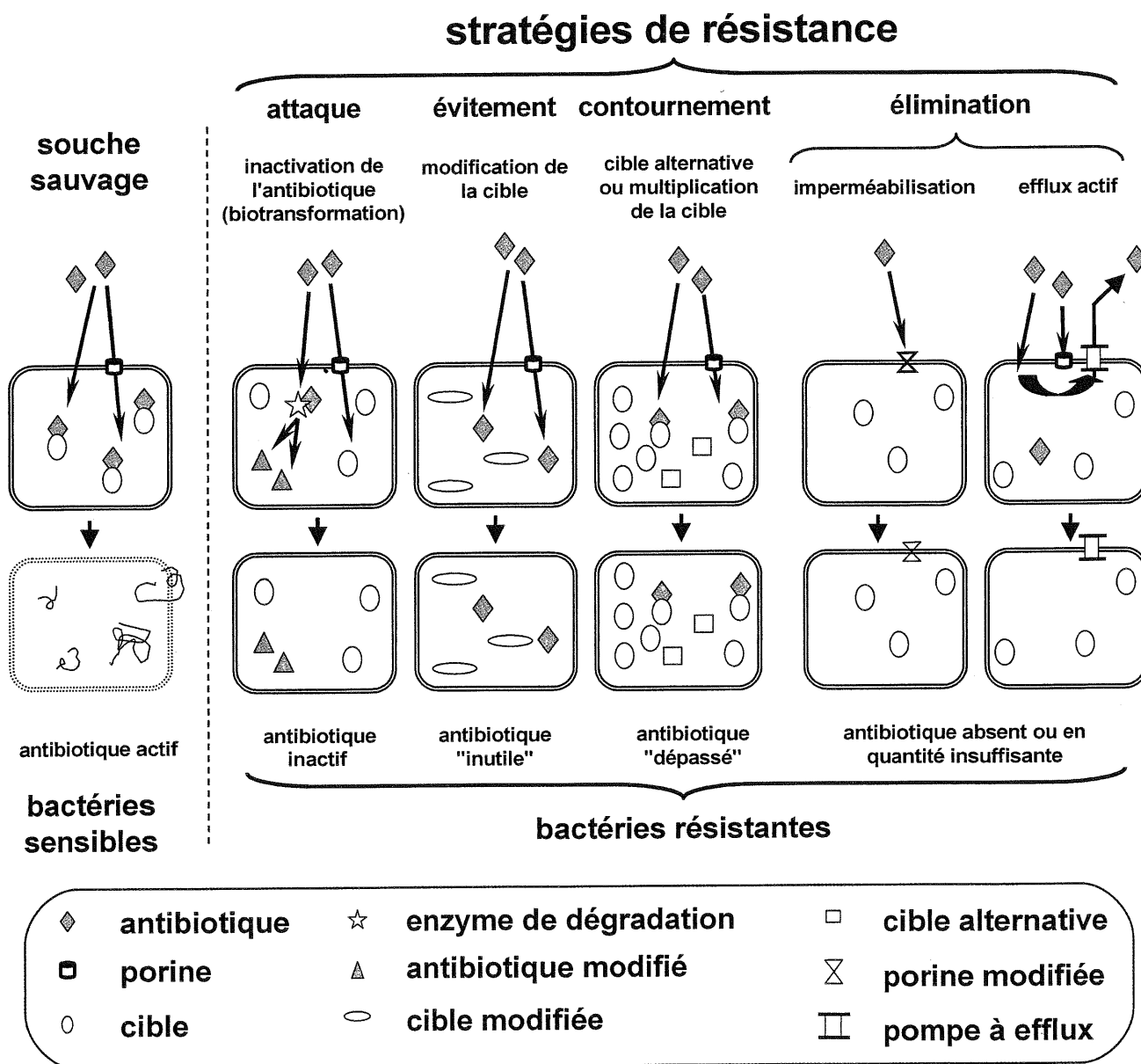
⁵ La plupart des antibiotiques étant des substances naturelles (ou développés à partir de substances naturelles actives), il est probable qu'une partie de la résistance naturelle soit en fait une adaptation des bactéries à la présence de ces substances dans l'environnement avant et indépendamment de toute intervention humaine.

tiques. On parle ici d'*espèces insensibles*⁵. La résistance acquise apparaît, quant à elle, au sein d'une espèce suite à l'utilisation des antibiotiques. On parle donc ici de souches insensibles (ou, si la résistance est de bas niveau, de *souches* à sensibilité diminuée). Les principaux mécanismes de la résistance acquise sont illustrés à la figure 1 et mettent en jeu quatre grands types de stratégies, toutes sous contrôle génétique, à savoir (i) la stratégie offensive (la bactérie produit une enzyme capable d'inactiver l'antibiotique), (ii) la stratégie d'évitement (une modification de la cible de l'antibiotique rend ce dernier inefficace), (iii) 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 (iv) la stratégie de la protection physique qui consiste soit à empêcher l'entrée de l'antibiotique dans la bactérie (impermeabilisation) soit à l'expulser (efflux actif).

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

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. Ceux-ci peuvent aussi se retrouver dans plusieurs espèces bactériennes différentes.



en Europe (18); (ii) *Streptococcus pneumoniae*, agent principal des pneumonies communautaires et des infections respiratoires en général, mais également impliqué dans des infections graves comme la méningite; (iii) *Escherichia coli*, responsable de la majorité des infections urinaires communautaires et d'un grand nombre d'infections intestinales; (iv) et enfin *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie présente dans l'environnement mais qui devient redoutable lorsqu'elle infecte des sujets aux défenses diminuées et est responsable de plus 10 % des infections nosocomiales.

DÉCOUVERTE DES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES PAR EFFLUX

Ce sont les travaux de Stuart Levy sur la résistance aux tétracyclines qui ont mis en évidence pour la première fois la capacité de *E. coli* d'expulser ces antibiotiques de la cellule (19). Au même moment, un mécanisme semblable avait été découvert dans des cellules transformées et devenues résistantes aux anthracyclines (20). Ce mécanisme devait être rapidement considéré comme important dans la compréhension des échecs thérapeutiques en oncologie car il pouvait affecter de nombreux agents anticancéreux sans relation structurelle apparente entre eux (21). Un progrès fondamental a été accompli lorsqu'on a compris que l'efflux constituait en fait un mécanisme très général pour expulser de la cellule des agents défavorables à sa survie. Ceci plaçait l'efflux des antibiotiques (22) dans le même cadre général que celui des anticancéreux et des antifongiques (23).

L'efflux semble une fonction essentielle car l'analyse génomique montre qu'une fraction importante (environ 10%) des protéines d'une cellule possède les propriétés nécessaires pour en faire des transporteurs d'efflux. Au-delà des médicaments, on a en effet observé l'efflux de bien d'autres substances dont les seuls points communs sont d'être potentiellement toxiques pour la cellule et d'être capables de passer au travers des membranes cellulaires. D'une façon encore plus générale, d'ailleurs, les mécanismes d'efflux ne sont sans doute qu'une partie d'un ensemble plus général et qui recouvre les divers mécanismes de transport (influx et efflux) de substances non-diffusibles au travers des membranes biologiques.

CLASSIFICATION DES TRANSPORTEURS ET MÉCANISME D'EFFLUX

Les transporteurs accomplissent d'abord diverses fonctions physiologiques d'influx ou d'efflux de nutriments (24), leur fonction d'efflux de molécules pharmacologiques n'étant souvent qu'opportuniste. Leur découverte est le résultat des efforts conjoints de chercheurs d'orientations très diverses et explique certaines des dénominations inattendues que nous verrons ci-dessous (voir par exemple le nom de «facilitateur» donné à toute une famille qui recouvre en fait des transporteurs de nombreux métabolites [25] et dont la fonction est de faciliter la survie de la cellule...). En se limitant aux transporteurs capables de reconnaître les antibiotiques les plus importants (26), les pompes

TABLEAU I

PRINCIPALES CLASSES DE TRANSPORTEURS D'EFFLUX RECONNUS COMME CAPABLES DE TRANSPORTER LES ANTIBIOTIQUES AU NIVEAU DES BACTÉRIES. CHAQUE CLASSE CONTIENT UN NOMBRE ÉLEVÉ DE TRANSPORTEURS DIFFÉRENTS DONT LES PROPRIÉTÉS ET DISTRIBUTIONS DANS LE MONDE BACTÉRIEN PEUVENT VARIER CONSIDÉRABLEMENT			
Famille (dénomination ^a)	acronyme	source d'énergie	Référence ^b
ATP-Binding Cassette	ABC	ATP	67
Multidrug And Toxic compound Extrusion	MATE	gradients d'ions	68
Major Facilitator Superfamily	MFS		69
Resistance-Nodulation-cell Division	RND		70
Small Multidrug Resistance	SMR		71

a 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 par après.

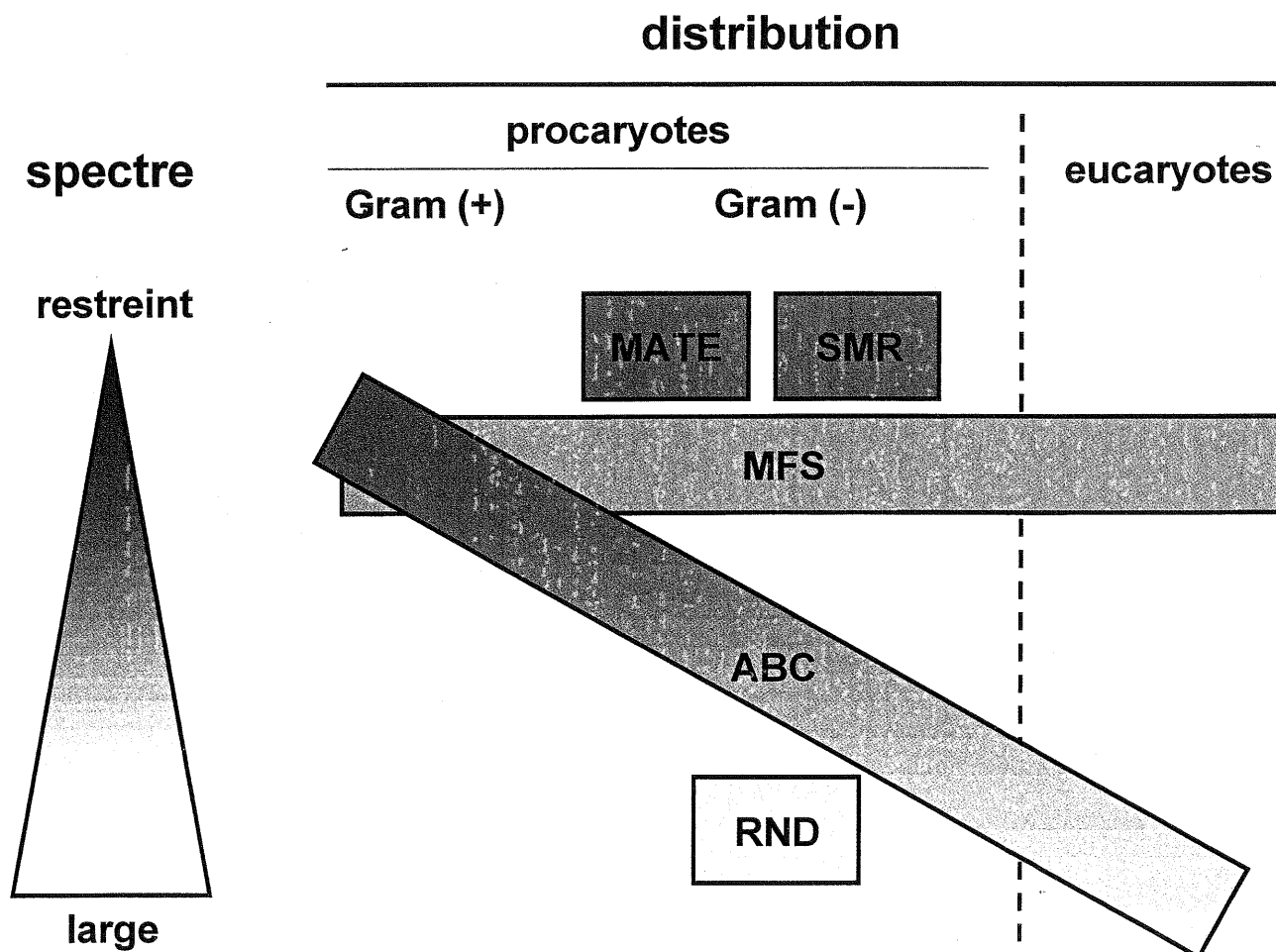
b articles ayant établi de façon indiscutable l'existence de la classe de transporteurs considérés. Voir les tableaux II et III pour les références au transport d'antibiotiques proprement dit (voir aussi les références 72,26 pour des descriptions plus détaillées)

à efflux peuvent être regroupées en cinq familles présentées au tableau I.

La figure 2 montre de façon combinée (i) le spectre de reconnaissance des antibiotiques par ces pompes à efflux, et (ii) leur distribution entre organismes Gram (+) et Gram (-) d'une part et entre procaryotes et eucaryotes d'autre part. 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 doit être très important pour la survie de toute cellule.

La topologie (c'est-à-dire la façon dont la ou les protéines se disposent au travers de la membrane) est montrée à la figure 3. Les transporteurs présents dans les bactéries Gram (+) ne sont constitués que d'une seule protéine (CMP: Cytoplasmic Membrane Protein) responsable directement de l'efflux vers l'espace situé sous le peptidoglycan à partir duquel les molécules peuvent diffuser aisément vers l'extérieur. Par contre, les transporteurs présents dans les bactéries Gram (-) sont constitués de trois protéines, la CMP, située dans la membrane interne et responsable de l'efflux proprement dit, et deux autres protéines, la première située au niveau de la membrane externe (OMP: Outer Membrane Protein) et la deuxième (MFP: Membrane Fusion Protein) assurant la jonction entre les deux membranes.

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). On voit que certains transporteurs se distribuent au travers de l'ensemble des espèces cellulaires (procaryotes [bactéries] et eucaryotes [cellules nucléées]) suggérant qu'ils accomplissent des tâches essentielles pour toute cellule. D'autres sont restreints à un groupe de bactéries (par ex. les Gram (-) dans le cas de RND) car ils sont davantage adaptés à la structure générale de ces organismes (fig. 3). On voit aussi que certains transporteurs ont un spectre étroit, tandis que d'autres sont capables de transporter des antibiotiques de classes très différentes. Construit sur base des données présentées dans la référence 73.

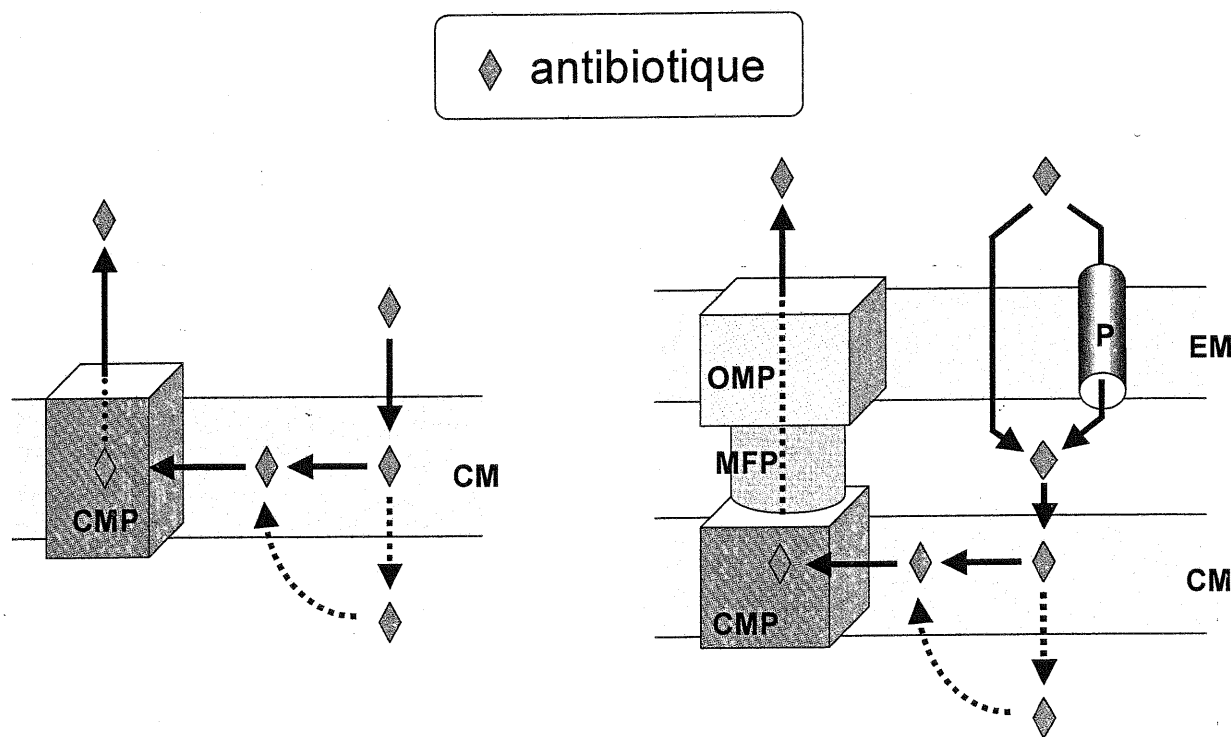


La figure 3 montre aussi que les antibiotiques sont captés par la CMP de façon préférentielle à partir de la membrane elle-même et non pas à partir du cytosol. Ceci explique que les pompes à efflux soient particulièrement efficaces vis-à-vis des molécules ayant des propriétés suffisantes de dissolution dans les lipides. Or, la plupart des médicaments, y compris les antibiotiques, sont des substances sélectionnées sur cette base afin d'atteindre leur cible dans l'organisme.

ETUDE 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 à propos de ces transporteurs. Nous avons volontairement limité les informations à celles concernant les anti-

Figure 3 – Organisation (topologie) générale des transporteurs d'antibiotiques dans les organismes Gram (+) (gauche) et Gram (-) (droite). Les abréviations sont données en anglais sur la figure afin de faciliter la recherche des informations dans les publications internationales. EM: membrane externe des bactéries Gram (-); CM: membrane cytoplasmique (unique dans les Gram [+]); appelée aussi membrane interne dans les Gram [-]); CMP: protéine responsable de la reconnaissance de substrat et enchâssée dans la membrane cytoplasmique (cette protéine constitue l'ensemble du transporteur chez les Gram [+]); MFP: protéine assurant la jonction entre la CMP et l'OMP chez les Gram (-); OMP: protéine enchâssée dans la membrane externe des Gram (-); en association avec la MFP et la CMP, elle constitue l'ensemble de l'appareil d'efflux. OMP et MFP ne sont pas spécifiques d'un transporteur précis et sont donc largement interchangeables. Les flèches décrivent le chemin probable des antibiotiques sujets à efflux. On pense qu'une fraction importante est captée par la CMP au moment du passage de la molécule au travers de la membrane cytoplasmique, mais une capture à partir du cytoplasme est aussi possible. Le fait que les β -lactames ne doivent pas pénétrer dans le cytoplasme bactérien pour agir (mais agissent au niveau du peptidoglycan situé au delà de la face externe de la membrane cytoplasmique) pourrait expliquer l'inutilité de transporteurs pour cette classe d'antibiotiques chez les Gram (+). Dans le cas des bactéries Gram (-), la molécule doit d'abord franchir la membrane externe, soit par diffusion soit par passage au travers d'une porine (canal hydrophile). On perçoit que l'efflux puisse coopérer avec un mécanisme d'imperméabilisation pour diminuer de façon importante non seulement la quantité d'un antibiotique devant atteindre le cytosol mais aussi celle des β -lactames (qui agissent dans l'espace intermembranaire; dans ce dernier cas une production de β -lactamase au niveau de cet espace intermembranaire réduira encore la concentration locale de β -lactame).



CM: cytoplasmic membrane
EM: external membrane
P: porin

CMP: cytoplasmic membrane protein
MFP: membrane fusion protein
OMP: outer membrane protein

TABLEAU II

TRANSPORTEURS D'ANTIBIOTIQUES CHEZ *S. AUREUS* ET *S. PNEUMONIAE*

organisme	famille ¹	système d'efflux	localisation du gène ²	antibiotique						antiseptiques
				β-lactames	aminoglycosides	fluoroquinolones	macrolides	tétracyclines	triméthoprime	sulfamides
<i>S. aureus</i>	ABC	MsrA	C				+			
		QacA	P							
	MFS	MdeA			+					
		NorA	C			+		+		
		Tet K-L	P							
<i>S. pneumoniae</i>	MFS	MefA	T				+			
		MefE	T				+			
		PmrA				+				
		Tet K-L	P					+		

¹ ABC : ATP-Binding Cassette superfamily ; MFS : Major Facilitator Superfamily² C : chromosome, P : plasmide, T : transposon³ composés quaternaires d'ammonium : bromure de cétrimonium, chlorure de benzalkonium

TABLEAU III – TRANSPORTEURS D'ANTIBIOTIQUES CHEZ *E. COLI* ET *P. AERUGINOSA*

organisme	famille ¹	système d'efflux	localisation du gène ²	antibiotique							antiseptiques
				β-lactames	aminoglycosides	fluoroquinolones	macrolides	tétracyclines	triméthoprime	sulfamides	
<i>E. coli</i>	ABC MATE MFS	MacAB-TolC	C			+	+		+	+	
		YdhE									
		Bcr						+			
		Dep						+			
		ErmAB-TolC				+		+	+		
		Fsr						+			
		MdtA	C					+			
		SetA			+						
		Tet A-E	P								
		YceI				+					
<i>P. aeruginosa</i>	RND	YebQ							+		
		AcrAB-TolC				+	+	+	+		
		AcrAD-TolC	C		+	+	+	+			
		AcrEF-TolC		+		+	+	+			
		YegN									
		ErmE					+	+		+	+
		SugE									
		Tet A, C, E	P					+			
		MexAB-OprM	C			+	+	+	+	+	
		MexCD-OprJ				+		+			
<i>P. aeruginosa</i>	MFS RND	MexEF-OprN				+		+			
		MexJK-OprM									
<i>P. aeruginosa</i>		MexXY-OprM	C		+		+	+			

¹ 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)

² C : chromosome, P: plasmide

biotiques d'usage clinique courant, mais il faut souligner que bien d'autres antibiotiques (ex : le chloramphénicol, l'acide fusidique, la rifampicine) sont des substrats fréquents des pompes à efflux (voir la ref. 27 pour une description détaillée de l'ensemble des antibiotiques reconnus par les pompes à efflux).

GRAM (+)

Les transporteurs présents dans ces groupes d'organismes (tableau II) sont le plus souvent à spectre étroit et ne reconnaissent donc de façon préférentielle qu'une ou deux classes d'antibiotiques. On n'y trouve pas de transporteurs pour les β -lactames, probablement en relation avec le fait que les cibles de ces antibiotiques (les PBP [Penicillin Binding Proteins]) sont situées à la face externe de la membrane.

Staphylococcus aureus

NorA (28) est responsable de l'efflux des fluoroquinolones et peut conférer une résistance détectable suite à des mutations au niveau du promoteur du gène correspondant (29). Le génome du *S. aureus* code pour au moins dix autres protéines putatives présentant des homologies de séquence avec NorA (30). Ceci laisse supposer que d'autres transporteurs encore non-identifiés soient également présents. Le transporteur MsrA est responsable de plus de 10 % des résistances aux macrolides dans des isolats cliniques de *S. aureus* sensibles à la méthicilline (31). Les transporteurs TetK-L sont impliqués dans la résistance à la tétracycline (32) et sont ubiquitaires. Enfin, MdeA reconnaît les aminoglycosides (33), phénomène assez surprenant compte tenu du caractère hydrophile de ces molécules. De façon assez inquiétante, on a également découvert des transporteurs (QacA) capables de reconnaître les antiseptiques, ce qui illustre bien le concept selon lequel les bactéries sont capables de se protéger contre une très grande variété de molécules toxiques (34).

Streptococcus pneumoniae

PmrA est un homologue du transporteur NorA du *S. aureus* (24 % d'identité) et transporte les fluoroquinolones (35, 36). MefA identifié en 1996 chez *S. pyogenes* (37)⁶ et son homologue MefE

(95 % d'identité au niveau génomique) découvert ensuite chez *S. pneumoniae* (38) sont associés à la résistance aux macrolides à 14 et 15 atomes. Très répandu en Amérique du Nord (39), sa prévalence est très variable d'un pays à l'autre en Europe. Il est aussi présent chez les streptocoques du groupe viridans, non-pathogènes eux-mêmes mais souvent considérés comme réservoir de déterminants de résistances pour les germes pathogènes (7).

GRAM (-)

Ces organismes possèdent un nombre important de transporteurs d'antibiotiques (tableau III) dont la plupart ont un spectre large. Le type de résistance qu'ils conféreront peut donc affecter un nombre élevé d'antibiotiques de classes différentes.

Escherichia coli

L'analyse du génome d'*E. coli* a montré la présence de gènes codant pour au moins 37 transporteurs caractérisés ou potentiels (40). AcrAB-TolC (41) est capable de transporter au moins cinq classes d'antibiotiques. AcrAB-TolC est, physiologiquement, un transporteur des sels biliaires et illustre bien le concept que les antibiotiques ne sont que des substrats opportunistes de systèmes de transport indispensables à la survie des bactéries dans leur environnement naturel. Les protéines AcrA et AcrB sont codées par un seul opéron (42). Par contre, TolC est codée indépendamment et est commune à de nombreux transporteurs. Ceci illustre le fait bien connu des biologistes que la nature utilise souvent les mêmes briques de base pour des constructions différentes. Les protéines Tet A-E sont, elles, responsables de l'efflux des tétracyclines du cytosol vers le périplasme (43) et représentent un des mécanismes majeurs de résistance aux tétracyclines dans l'ensemble des Gram (-) (44).

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa est un organisme naturellement résistant à un grand nombre d'antibiotiques, ce qui a été longtemps attribué à une imperméabilité de sa membrane externe aux molécules étudiées. Mais la découverte de la première pompe à efflux constitutive chez cet organisme (MexAB-OprM

⁶ ce transporteur est responsable d'environ 50 % de la résistance de *S. pyogenes* vis-à-vis des macrolides en Belgique

[45]) a montré que la résistance naturelle de *P. aeruginosa* résulte en grande partie de l'expression de systèmes d'efflux ([46] ; il pourrait en être de même pour la résistance adaptative de *P. aeruginosa* vis-à-vis des aminoglycosides [47]). L'analyse du génome de *P. aeruginosa* montre en fait la présence de séquences codantes pour seize transporteurs RND potentiels (48). Comme dans le cas de *E. coli*, les protéines de la membrane externe (OMP) sont interchangeables entre transporteurs, ce qui démontre que la spécificité de substrat dépend essentiellement de la protéine de la membrane interne (CMP). Codés par des unités de transcription distinctes, les synthèses de CMP et OMP sont placées néanmoins sous le contrôle d'un gène régulateur unique (44), ce qui peut entraîner la surexpression simultanée des transporteurs. Comme l'expression de ces protéines est constitutivement réprimée, une mutation au niveau du gène codant pour le répresseur entraînera la résistance simultanée à plusieurs antibiotiques [49]).

IMPACT DE L'EFFLUX SUR LA RÉSISTANCE CLINIQUE AUX ANTIBIOTIQUES

La signification clinique de la résistance aux antibiotiques par un mécanisme d'efflux a fait initialement l'objet de controverses car les premières études ne montraient qu'une légère augmentation des CMI (50). 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 sur la base des points critiques conventionnels. Mais au fil du temps, les éléments suivants se sont avérés importants à prendre en compte dans le cadre d'une politique antibiotique rationnelle.

1. la plupart des transporteurs sont inductibles. Ce phénomène d'induction n'est pas facilement détectable par les techniques de sensibilité *in vitro* et n'est généralement associé qu'à des bas niveaux de résistance, ce qui peut entraîner une réelle sous-estimation des taux de résistances par rapport à ceux déterminés par le laboratoire. Si l'induction concerne un transporteur à large spectre, elle peut conférer d'emblée une multirésistance affectant de nombreuses classes d'antibiotiques souvent non-apparentées à l'antibiotique inducteur (par la diminution de sensibilité simultanée vis-à-vis du méropénème et des céphalosporines de 3^e et 4^e génération suite à l'exposition à

la ciprofloxacine [51]). Le clinicien pourra être donc surpris par l'apparition de ces résistances inattendues. Ce phénomène peut être particulièrement important au cours d'un traitement antibiotique mené avec des doses subinhibitrices.

2. les mécanismes d'efflux peuvent coopérer avec d'autres mécanismes pour déterminer un haut niveau de résistance (par exemple, pour les β -lactames et chez *P. aeruginosa* : combinaison d'une faible perméabilité, de la surexpression du transporteur MexAB-OprM, et d'une β -lactamase de type AmpC [52]; dans le cas des macrolides et chez les streptocoques: association de la pompe à efflux MefA et de la méthylation du ribosome [53]).
3. l'expression concomitante de plusieurs pompes à efflux reconnaissant un même antibiotique peut entraîner d'emblée une résistance de haut niveau (54), et la co-expression de plusieurs pompes suite à la mutation d'un régulateur commun entraîne une multi-résistance (55).
4. l'activité des pompes à efflux augmente le risque de sélection de mutants résistants par diminution de la concentration intrabactérienne. A contrario, on a pu montrer que la disruption des pompes à efflux chez *P. aeruginosa* accroît non seulement la sensibilité à certains antibiotiques (p.ex. la lévofloxacine), mais diminue également la fréquence de sélection des mutants résistants (56).
5. enfin, les gènes codant pour des pompes à efflux sont souvent situés sur des éléments génétiques mobiles et transférables tels les plasmides ou les transposons, et peuvent donc être facilement transférés d'une bactérie résistante à une bactérie sensible. Ceci 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 kétolidés (actuellement représentés par la seule télithromycine), les fluoroquinolones lipophiles (représentés 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, les fluoroquinolones

hydrophiles [ciprofloxacine, norfloxacine, lévofloxacine] ou le méropénème). Il semble dès lors important dans le futur de pouvoir apprécier et quantifier de façon précise les taux de résistance par mécanisme d'efflux au sein de différentes espèces bactériennes pour chaque antibiotique en particulier. Les choix thérapeutiques doivent donc aller bien au-delà de celui d'une classe pharmacologique donnée.

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

La résistance de bas niveau résultant de la sur-expression des pompes à efflux est souvent ignorée, et un nombre non négligeable de souches déclarées sensibles par les méthodes conventionnelles sont en réalité porteuses de mécanismes d'efflux et, donc, en voie d'acquisition potentielle de résistances de haut niveau (57). Ces souches répondent moins bien aux traitements standards car les doses établies sur base des données d'enregistrement ont été définies sur base d'études parfois anciennes et concernant souvent des populations bactériennes sans mécanisme d'efflux. Face à des souches exprimant une ou plusieurs pompes à efflux, ces posologies pourraient ne plus permettre d'atteindre les seuils pharmacodynamiques nécessaires (un article précédent [58] analyse en détail cette notion de relation entre dosage et efficacité thérapeutique et analyse les paramètres pharmacodynamiques à prendre en considération pour chaque classe d'antibiotique; voir aussi les références 59-61 pour des revues récentes).

Il est donc 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 » occulte, en effet, des différences parfois importantes entre souches totalement sensibles (correspondant aux souches sauvages) et souches à sensibilité diminuée mais encore catégorisées comme « sensibles » sur base des critères classiques. Ceci 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 ou inversement, qu'il soit mis en garde vis-à-vis des molécules pour lesquelles une résistance croisée peut être attendue

(dans la classe considérée, mais surtout au-delà de cette classe).

Au niveau du laboratoire, il apparaît essentiel de mettre en place les moyens de détecter la présence des pompes à efflux. A minima, ceci 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 ceci même si ces antibiotiques ne sont pas nécessairement en usage clinique dans l'hôpital). La mise en évidence phénotypique des mécanismes de résistance par efflux par l'utilisation de substrats inhibiteurs des pompes à efflux pourrait aussi s'avérer un outil utile dans le futur.

En termes de Santé Publique, il serait utile d'implémenter au niveau des laboratoires de référence, les procédures permettant une surveillance systématique de la fréquence et de l'impact des pompes à efflux en ce qui concerne les germes d'intérêt général et, en particulier, dans les populations ou dans les groupes à risque. Ceci permettrait non seulement de préciser l'importance du phénomène, mais surtout d'anticiper les éventuelles conséquences thérapeutiques (en terme de choix d'antibiotique ou de posologies à appliquer). Associé aux autres outils dont les autorités en charge de la Santé Publique disposent 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 individuel à court terme que pour la population en général à moyen et long terme.

Enfin, le développement de résistances par efflux vis-à-vis des désinfectants nous paraît un élément particulièrement inquiétant au niveau de l'hôpital et, à nouveau en termes de Santé Publique. Outre la mise en échec des méthodes actuelles de désinfection, ces résistances peuvent conduire à une résistance croisée vis-à-vis d'antibiotiques (62, 63). Plusieurs articles récents soulignent que l'usage excessif des désinfectants sans précautions particulières pourrait ainsi contribuer à sélectionner des isolats résistants chez *S. aureus* (64), *E. coli* (65) et *P. aeruginosa* (66). 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 l'objet d'une surveillance accrue à l'avenir.

REMERCIEMENTS

NM est chercheur post-doctoral dans le cadre de l'action «Prospective Research in Brussels» de la Région de Bruxelles-Capitale. FVB est Chercheur Qualifié du Fonds National de la Recherche Scientifique.



RÉFÉRENCES

- Adam D: Global antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2002; **50** Suppl: 1-5.
- Glupczynski Y, Delmee M, Goossens H, Struelens M: Distribution and prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolates in intensive care units (ICU) in Belgian hospitals between 1996 and 1999. *Acta Clin Belg*. 2001; **56**: 297-306.
- Van Eldere J: Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *J Antimicrob Chemother*. 2003; **51**: 347-352.
- Palavecino E: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Lab Med*. 2004; **24**: 403-418.
- Verhaegen J, Van D, V, Verbiest N, Van Eldere J, Verbist L: Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Belgium-update (1994-98). *Clin Microbiol Infect*. 2000; **6**: 308-315.
- Vanhoof R, Carpentier M, Cartuyvels R, Damee S, Fagnart O, Garrino MG et al.: Surveillance of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected in Belgium during winter 2000-2001. *Acta Clin Belg*. 2003; **58**: 111-119.
- Malhotra-Kumar S, Lammens C, Martel A, Mallentier C, Chapelle S, Verhoeven J et al.: Oropharyngeal carriage of macrolide-resistant viridans group streptococci: a prevalence study among healthy adults in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. 2004; **53**: 271-276.
- Cars O, Molstad S, Melander A: Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet*. 2001; **357**: 1851-1853.
- Pichichero ME: Understanding antibiotic overuse for respiratory tract infections in children. *Pediatrics*. 1999; **104**: 1384-1388.
- Deschepper R, Vander Stichele RH, Haaijer-Ruskamp FM: Cross-cultural differences in lay attitudes and utilisation of antibiotics in a Belgian and a Dutch city. *Patient Educ Couns*. 2002; **48**: 161-169.
- Guillemot D: Antibiotic use in humans and bacterial resistance. *Curr Opin Microbiol*. 1999; **2**: 494-498.
- MacGowan A, Bowker K: Developments in PK/PD: optimising efficacy and prevention of resistance. A critical review of PK/PD in *in vitro* models. *Int J Antimicrob Agents*. 2002; **19**: 291-298.
- Zinner SH, Lubenko IV, Gilbert D, Simmons K, Zhao X, Drlica K, Firsov AA: Emergence of resistant *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* dynamic model that simulates moxifloxacin concentrations inside and outside the mutant selection window: related changes in susceptibility, resistance frequency and bacterial killing. *J Antimicrob Chemother*. 2003; **52**: 616-622.
- Garau J: Treatment of drug-resistant pneumococcal pneumonia. *Lancet Infect Dis*. 2002; **2**: 404-415.
- Lonks JR, Garau J, Gomez L, Xercavins M, Ochoa dE, Gareen IF et al.: Failure of macrolide antibiotic treatment in patients with bacteremia due to erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis*. 2002; **35**: 556-564.
- Lonks JR: What Is the Clinical Impact of Macrolide Resistance? *Curr Infect Dis Rep*. 2004; **6**: 7-12.
- Docze A, Mraz M, Grey E, Bucko E, Korcova J, Svetlansky I et al.: Penicillin resistance in viridans streptococcal bacteremia is related with high mortality. *Scand J Infect Dis*. 2003; **35**: 916-917.
- Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH 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**: 639-644.
- Levy SB, McMurry L: Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. *Nature*. 1978; **276**: 90-92.
- 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**: 2200-2203.
- Gerlach JH, Kartner N, Bell DR, Ling V: Multidrug resistance. *Cancer Surv*. 1986; **5**: 25-46.
- Saier MH, Jr, Paulsen IT, Matin A: A bacterial model system for understanding multi-drug resistance. *Microb Drug Resist*. 1997; **3**: 289-295.
- Kolaczowski M, Goffeau A: Active efflux by multidrug transporters as one of the strategies to evade chemotherapy and novel practical implications of yeast pleiotropic drug resistance. *Pharmacol Ther*. 1997; **76**: 219-242.
- 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.
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr: Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; **62**: 1-34.
- Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM: Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol*. 2000; **60**: 457-470.
- Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plesiat P, Pechere JC, Tulkens PM: Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother*. 2003; **51**: 1055-1065.
- 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**: 6942-6949.
- Kaatz GW, Seo SM, Foster TJ: Introduction of a *norA* promoter region mutation into the chromosome of a fluoroquinolone-susceptible strain of *Staphylococcus aureus* using plasmid integration. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; **43**: 2222-2224.
- Kaatz GW, Seo SM, O'Brien L, Wahiduzzaman M, Foster TJ: Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from *NorA* in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; **44**: 1404-1406.
- Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, Boos M, Geisel R, Kohrer K et al.: Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2000; **45**: 891-894.
- Roberts MC: Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev*. 1996; **19**: 1-24.
- Huang J, O'Toole PW, Shen W, Amrine-Madsen H, Jiang X, Lobo N et al.: Novel chromosomally encoded multidrug efflux transporter *MdeA* in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; **48**: 909-917.
- Littlejohn TG, Paulsen IT, Gillespie MT, Tennent JM, Midgley M, Jones IG et al.: Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1992; **74**: 259-265.
- Gill MJ, Brenwald NP, Wise R: Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; **43**: 187-189.
- Piddock LJ, Johnson MM, Simjee S, Pumbwe L: Expression of efflux pump gene *pmrA* in fluoroquinolone-resistant and -susceptible clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; **46**: 808-812.
- Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath AV et al.: Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*,

- from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol*. 1996; 22: 867-879.
38. Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, Dib-Hajj F, Wondrack L, Yuan W, Sutcliffe J: *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 2251-2255.
 39. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Felmingham D: Molecular characterization of macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated from the PROTEKT 1999-2000 study. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50 Suppl S1: 39-47.
 40. Nishino K, Yamaguchi A: Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2001; 183: 5803-5812.
 41. Nakamura H, Hachiya N, Tojo T: Second acriflavine sensitivity mutation, *acrB*, in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*. 1978; 134: 1184-1187.
 42. Ma D, Cook DN, Hearst JE, Nikaido H: Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. *Trends Microbiol*. 1994; 2: 489-493.
 43. Thanassi DG, Suh GS, Nikaido H: Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1995; 177: 998-1007.
 44. Li XZ, Nikaido H: Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. 2004; 64: 159-204.
 45. Nikaido H: Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*. 1994; 264: 382-388.
 46. Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida H, Mistry A, Warren MS et al.: Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43: 1340-1346.
 47. Hocquet D, Vagne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, et al.: *MexXY-OprM* efflux pump is necessary for an adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 1371-1375.
 48. Schweizer HP: Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res*. 2003; 2: 48-62.
 49. Boutoille D, Corvec S, Caroff N, Giraudeau C, Espaze E, Caillon J et al.: Detection of an IS21 insertion sequence in the *mexR* gene of *Pseudomonas aeruginosa* increasing beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 230: 143-146.
 50. Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida H, Mistry A, Warren MS et al.: Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43: 1340-1346.
 51. Le Thomas I, 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: 553-555.
 52. 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: 1964-1971.
 53. 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: 764-768.
 54. Lee A, Mao W, Warren MS, Mistry A, Hoshino K, Okumura R, Ishida H, Lomovskaya O: Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *J Bacteriol*. 2000; 182: 3142-3150.
 55. Llanes C, Hocquet D, Vagne 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; 48: 1797-1802.
 56. Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida H, Mistry A, Warren MS et al.: Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43: 1340-1346.
 57. Baquero F: Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resist Updat*. 2001; 4: 93-105.
 58. Van Bambeke F, Tyteca D, Ouadhriri Y, Tulkens PM: Optimisation des traitements antibactériens sur base des propriétés pharmacodynamiques des antibiotiques. *Louvain Med*. 1999; 118: 43-63.
 59. Craig WA: Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of beta-lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infect Dis Clin North Am*. 2003; 17: 479-501.
 60. Drusano GL: Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of 'bug and drug'. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2: 289-300.
 61. McKinnon PS, Davis SL: Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of bacterial infectious diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23: 271-288.
 62. Schweizer HP: Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett*. 2001; 202: 1-7.
 63. Denyer SP, Maillard JY: Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol*. 2002; 92 Suppl: 35S-45S.
 64. Russell AD: Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *J Appl Microbiol*. 2002; 92 Suppl: 121S-135S.
 65. Langsrud S, Sundheim G, Holck AL: Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers. *J Appl Microbiol*. 2004; 96: 201-208.
 66. Chuanchuen R, Beinlich K, Hoang TT, Becher A, Karkhoff-Schweizer RR, Schweizer HP: Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing *MexCD-OprJ*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 428-432.
 67. Fath MJ, Kolter R: ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev*. 1993; 57: 995-1017.
 68. Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA: The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol Microbiol*. 1999; 31: 394-395.
 69. Saier MH, Jr, Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WH, Huang SC et al.: The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 1999; 1: 257-279.
 70. Saier MH, Jr, Tam R, Reizer A, Reizer J: Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol*. 1994; 11: 841-847.
 71. Paulsen IT, Skurray RA, Tam R, Saier MH, Jr, Turner RJ, Weiner JH et al.: The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol Microbiol*. 1996; 19: 1167-1175.
 72. Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plesiat P, Pechere JC, Tulkens PM: Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51: 1055-1065.