

CONTRIBUTION DU DIAGNOSTIC BIOCHIMIQUE BACTERIEN DANS L'ETABLISSEMENT DES PARENTES PHYLOGENETIQUES : CAS DES *Enterobacteriaceae* ET *Pseudomonas* sp.

Reçu le 10/12/2010 – Accepté le 18/11/2011

M. A. HAMIDECHI¹, M. MEZIANI

¹Laboratoire de Microbiologie. Département de Biochimie-Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
Université Mentouri-Constantine. Algérie.

Résumé

Dix souches bactériennes ont été isolées à partir des prélèvements cliniques fournies par le laboratoire de bactériologie (Daksi, Constantine). Parmi les dix souches étudiées, huit appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et deux font partie des *Pseudomonadaceae*. Ces souches ont été identifiées présomptivement selon leurs caractères biochimiques, leur sensibilité ou leur résistance aux antibiotiques, et leur taux d'azote total mesuré par la méthode Kjeldahl. Un profil phylogénétique a été réalisé par les méthodes phénétiques basées sur le calcul de distances génétiques, en utilisant l'algorithme du Neighbor Joining (NJ) et l'analyse bioinformatique des séquences de l'ARNr 16S en vue de comparer les deux phylogénies (phénotypique et génotypique). L'analyse des topologies obtenues a permis de montrer que le phénotype biochimique présente certaines limites dans l'identification bactérienne et que l'analyse des séquences de l'ARNr 16S est un outil déterminant dans l'identification bactérienne à l'échelle de l'espèce.

Mots clés : *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, phénotype, phylogénie.

Abstract

Ten bacterial strains were isolated from clinical samples provided by the bacteriology laboratory (Daksi, Constantine). Among the ten strains studied, eight belong to the *Enterobacteriaceae* and two are among the *Pseudomonadaceae*. These strains were presumptively identified by their biochemical characteristics, susceptibility or resistance to antibiotics, and total nitrogen measured by the Kjeldahl method. A phylogenetic profile was produced by phenetic methods based on the calculation of genetic distances using the Neighbor Joining algorithm (NJ) and bioinformatics analysis of 16S rRNA sequences to compare the two phylogenies (phenotypic and genotypic). The analysis of topologies obtained showed that the biochemical phenotype has some limitations in bacterial identification and sequence analysis of 16S rRNA is a key tool in bacterial identification across the case.

Keywords : *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, phenotype, phylogeny.

ملخص

تم عزل عشرة سلالات بكتيرية من العينات التي يقدمها مختبر علم الجراثيم (دقسي، قسنطينة) من بين 10 سلالات، ثمانية ينتمون إلى البكتيريا المعوية، واثنان من بين *Pseudomonas*. وقد تم تحديد هذه السلالات المفترضة بواسطة خصائصها الكيميائية الحيوية، وقابليتها أو مقاومتها للمضادات الحيوية، وكمية النروجين الكلي بطريقة كلداهل. وأعد الملف النشوء والتطور من خلال طرائق مظهرية على أساس حساب المسافات الوراثية باستخدام خوارزمية Neighbor Joining (NJ) وتحليل المعلومات البيولوجية من ARN16S لمقارنة. وأظهر تحليل طبولوجيا التي تم الحصول عليها من أن النمط الظاهري البيوكيميائية له بعض القيود في تحديد السلالة كما أن تحليل تسلسل S16 هو أداة رئيسية في التحديد الجرثومي.

الكلمات المفتاحية : *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, النشوء والتطور.

Les entérobactéries, avec le genre *Pseudomonas*, forment des bacilles à Gram négatif qui constituent une part importante des bactéries isolées lors du diagnostic bactériologique des infections humaines notamment les infections urinaires [1]. Leur multirésistance aux antibiotiques et leur pouvoir d'adaptation expliquent la variété des espèces et les multiples circonstances dans lesquelles elles sont isolées.

L'importance médicale de ces bactéries et leur grand intérêt comme matériel de recherche font de ces groupes bactériens les mieux connus et les plus étudiés. Le développement du matériel d'analyse a considérablement contribué dans l'avancement de la systématique et les méthodes de diagnostic. Face à cette avancée, est-il suffisant de dresser des conclusions quant aux méthodes phénotypiques employées en bactériologie ?

Le but de cette étude est de confirmer ou infirmer la contribution des analyses biochimiques dans la détermination bactérienne, en utilisant des méthodes à la fois phénotypiques et bioinformatiques.

MATERIEL ET METHODE

Notre étude a porté sur des souches pré-identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie de la clinique rénale (Daksi-Constantine), par des méthodes microbiologiques conventionnelles (galerie biochimique). Nous avons étudié huit souches d'entérobactéries et deux souches de bacilles à Gram négatif non fermentaires (*Pseudomonas*) ; soit un total de dix souches dont la distribution est donnée dans le tableau 1. Ce travail a été effectué aux laboratoires de microbiologie et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université Mentouri-Constantine), dans lesquels nous avons réalisé un ensemble d'analyses microbiologiques et biochimiques sur les différentes souches fournies par le laboratoire de bactériologie de la clinique rénale (Daksi - Constantine).

Tableau 1 : Répartition et codage des souches analysées

Famille	Espèces	Nombre	Code
<i>Entérobactériaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	4	EC1, EC2, EC3, EC4
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	KP1, KP2
	<i>Serratia marcescens</i>	1	SM
	<i>Proteus mirabilis</i>	1	PROT
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	PS1, PS2

Analyse bactériologique

L'identification des souches a porté sur une série de tests biochimiques dont les différents tests ayant servi à l'identification sont :

- Gaz en glucose, production d'H₂S, métabolisme du lactose et du saccharose. (Milieu TSI).
- Utilisation du citrate en tant que seule source de carbone (cycle de Krebs).
- Production d'indole (métabolisme du Tryptophane).
- Mannitol-mobilité.
- Production de l'oxydase (physiologie respiratoire).
- Production de catalase (physiologie respiratoire).
- Production de la β -galactosidase (ONPG) (enzyme exocellulaire).
- Test VP (Voges-Proskauer) : fermentation butanediolique et production d'acétoïne.
- Test RM (Rouge de Méthyle) : fermentation des acides mixtes.
- Production de l'uréase : métabolisme protéique.
- Production des décarboxylases ODC, LDC et dihydrolases ADH bactériennes : métabolisme des acides aminés.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [2].

Les antibiotiques suivants ont été testés : Céfoxitine, ampicilline, gentamycine, augmentin (amoxicilline + acide clavulanique), cotrimoxazole, acide nalidixique, ciprofloxacine, kanamycine, céfotaxime, amoxicilline. Dont leurs diamètres critiques sont représentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Diamètres critiques pour l'appréciation de la Sensibilité/Résistance selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Antibiotique	Chage (μ g)	Diamètres critiques (mm)	
		Sensible	résistant
FOX	30	≥ 22	< 15
AM	10	≥ 21	< 16
CN	10	≥ 15	< 13
AX+AMC	30	≥ 23	< 16
SXT	25	≥ 17	< 11
NA	30	≥ 20	< 15
CIP	5	≥ 25	< 22
K	30	≥ 21	< 19
CTX	30	≥ 26	< 23
AX	25	≥ 23	< 16

FOX :Céfoxitine, **AM** : Ampicilline, **CN** : Gentamycine, **AX** : Amoxicilline, **AMC** : Acide clavulanique, **SXT** : Cotrimoxazole, **NA** : Acide nalidixique, **CIP** : Ciprofloxacine, **K** : Kanamycine, **CTX** : Céfotaxime.

Le dosage de l'azote total a été réalisé par la méthode Kjeldahl qui comprend deux étapes : la minéralisation et la distillation [3].

Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique comprend : la codification des états des caractères et le calcul du coefficient de similarité de Jaccard pour construire l'arbre phylogénétique phénotypique (phénoگرامme).

Codification des états des caractères

La codification établie pour les différents états des caractères étudiés est résumée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Codage des états des caractères

Caractères	Code 1	Code 0
Tests biochimiques	positif	négatif
Mobilité	Mobile	Immobile
Sensibilité antibiotiques	Résistante	Sensible
N ₂ (%)	> Moyenne	< Moyenne

Calcul du coefficient de similarité et matrice des distances

La taxonomie numérique a permis de construire une matrice numérique de type 1/0 (matrice binaire). Cette dernière servira pour construire une matrice de similarité en calculant l'indice de similarité (I_s) selon l'équation suivante :

$$I_s = \frac{(1,1)}{(1,1)+(1,0)+(0,1)}$$

(1,1) = les deux états du caractère étudié sont présents dans les deux bactéries.

(1,0) = l'état est présent dans la première bactérie et absent dans la deuxième.

(0,1) = l'état est absent dans la première bactérie et présent dans la deuxième.

Cet indice, à son tour, va servir pour construire une matrice des distances (d). Elle est calculée à partir des valeurs de (I_s) en utilisant équation :

$$d = 1 - I_s$$

Cette transformation a abouti à l'obtention d'une matrice arithmétique qui permettra la construction de l'arbre phylogénétique grâce au logiciel de construction des

dendrogrammes disponible sur Mobyle portal [4]. La méthode est basée sur le calcul des distances qui utilise l'algorithme Neighbor Joining.

RESULTATS

L'étude de différents tests biochimiques, la sensibilité aux antibiotiques, et le dosage de l'azote total a permis d'obtenir des résultats qui sont représentés dans une matrice binaire dont chaque état de chaque caractère est codifié par 1 ou 0. (Tableau 4).

	EC1	EC2	EC3	EC4	KPI	KP2	SM	Prot	PS1	PS2
Lac	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Sacch	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Gaz	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
H ₂ S	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Cit	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Ind	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Man	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
Mob	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
Oxy	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Cat	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ONPG	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
RM	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
VP	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
LDC	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
ODC	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
ADH	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Uréase	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
N ₂	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1
FX30	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
AM10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CN10	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
AMC10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SXT25	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
NA30	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1
CIP5	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
K30	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
CTX30	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
AX25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Calcul du Coefficient de Jaccard (I_s)

Le calcul du coefficient de Jaccard qui quantifie la similitude pour chaque couple bactérien a permis de calculer la matrice de similarité. Une fois calculée, cette matrice servira pour le calcul et la construction de la matrice des distances.

Les deux matrices de similitude et des distances sont représentées dans les tableaux 5 et 6 respectivement.

Tableau 5: Matrice de similarité inter-individus

	EC1	EC2	EC3	EC4	KP1	KP2	SM	PROT	PS1
EC2	0,76								
EC3	0,92	0,81							
EC4	0,77	0,86	0,82						
KP1	0,63	0,45	0,55	0,47					
KP2	0,45	0,55	0,47	0,57	0,61				
SM	0,47	0,36	0,43	0,39	0,63	0,45			
PROT	0,47	0,40	0,47	0,50	0,41	0,42	0,39		
PS1	0,43	0,26	0,39	0,34	0,45	0,34	0,57	0,40	
PS2	0,33	0,21	0,29	0,30	0,41	0,30	0,60	0,42	0,82

Tableau 6: Matrice des distances

	EC1	EC2	EC3	EC4	KP1	KP2	SM	PROT	PS1
EC2	0,24								
EC3	0,08	0,19							
EC4	0,23	0,14	0,18						
KP1	0,37	0,55	0,45	0,53					
KP2	0,55	0,45	0,53	0,43	0,39				
SM	0,53	0,64	0,57	0,61	0,37	0,55			
PROT	0,53	0,60	0,53	0,50	0,59	0,58	0,61		
PS1	0,57	0,74	0,61	0,66	0,55	0,66	0,43	0,60	
PS2	0,67	0,79	0,71	0,70	0,59	0,70	0,40	0,58	0,18

Construction des arbres phylogénétiques

La matrice de distance obtenue a été traitée grâce à un logiciel de construction des arbres phylogénétiques sur Mobyle portal. La méthode NJ utilisée a donné l'arbre phylogénétique suivant :

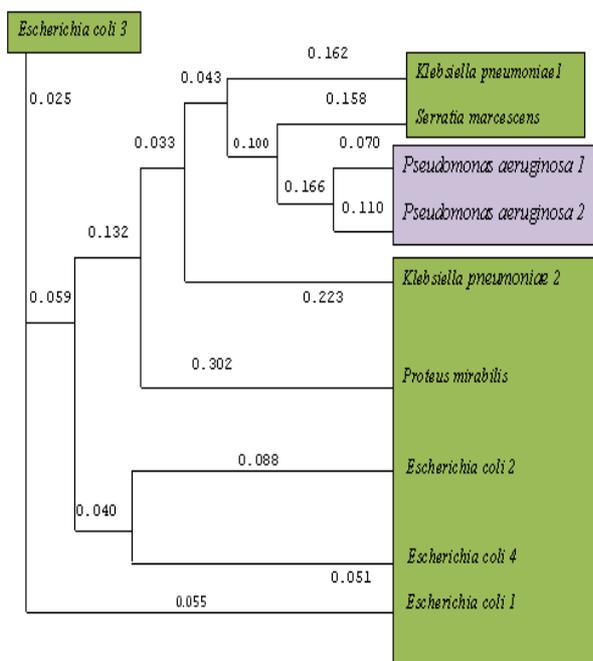


Figure 1: Arbre phylogénétique des souches étudiées construit selon la méthode NJ

DISCUSSION

Tests biochimiques

L'identification présomptive des bactéries a été effectuée en comparant nos résultats avec ceux relevés sur des références de systématiques bactériennes [5, 6, 7].

D'une manière générale, d'après notre étude et la série de tests biochimiques que nous avons réalisés, nos résultats montrent qu'ils sont dans la majorité des cas stables et intéressants pour l'identification bactérienne. Selon Pilet [8], l'identification des entérobactéries et *Pseudomonas* commence par la détermination de la famille, ensuite du genre et enfin des différentes espèces par la galerie classique. Cependant, c'est sur l'étude des caractères biochimiques que repose le diagnostic d'espèce.

Les discordances liées à la recherche de certains caractères peuvent être expliqués par une mauvaise manipulation dont la contamination qui est un phénomène courant lors d'isolement des bactéries au niveau du laboratoire qui est à l'origine de difficulté d'avoir une

souche pure, ou bien ces discordances sont dues à la mutation qui nécessite une grande attention quand on sait que la mutation et le réarrangement sont deux mécanismes permettant aux bactéries de créer de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques, à travers une modification ponctuelle ou un réarrangement de leurs ADN.

Sensibilité et résistance aux antibiotiques

Chaque souche identifiée a été soumise à un antibiogramme afin de déterminer la sensibilité et la résistance aux différents antibiotiques.

D'après cette étude, les résultats obtenus montrent que 100% des souches testées d'*Escherichia coli* sont résistantes à l'ampicilline, l'amoxicilline, et l'association d'acide clavulanique et l'amoxicilline, par contre elles présentent le phénotype sensible aux céfoxitine, gentamycine, et céfotaxime.

En ce qui concerne les autres antibiotiques, nous observons qu'au sein de la même espèce et pour le même antibiotique il y a des souches qui présentent le phénotype sensible et d'autres présentent le phénotype résistant.

D'une manière générale, en prenant le cas de l'amoxicilline, l'ampicilline, et l'association d'acide clavulanique et l'amoxicilline, nous remarquons que nos résultats sont conformes aux autres travaux [9,10].

Par contre dans le cas par exemple de la gentamycine, nos résultats présentent une discordance avec les autres résultats [11], qui ont confirmé la résistance d'*Escherichia coli* à la gentamycine, alors que dans notre étude, nous avons trouvé que 100% des souches de cette espèce étaient sensibles.

De même, pour les autres souches d'entérobactéries que nous avons testées. Leur comportement avec les antibiotiques diffère, des fois les souches bactériennes analysées présentent des sensibilités ou des résistances qui sont en parfait accord avec les résultats rapportés par d'autres auteurs, et parfois elles présentent une discordance.

Concernant les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, elles sont toutes résistantes aux antibiotiques testés dans notre travail, sauf pour la gentamycine et la ciprofloxacine où certaines souches sont sensibles et d'autres sont résistantes.

Selon les autres travaux publiés [12,13], les résistances que nous avons identifiées sont donc en parfait accord avec les résistances naturelles de ces bactéries.

A coté de ces résistances naturelles, certaines souches ont tendance à acquérir une résistance vis-à-vis de l'antibiotique, une souche sensible à un antibiotique donné peut devenir résistante, donc c'est une résistance acquise due à la mutagénèse.

Les discordances liées à la recherche de résistance ou de sensibilité des bactéries aux différents antibiotiques peuvent être expliquées par les erreurs au cours de la manipulation qui sont liées aux : inoculum non standardisé qui traduit de fausses résistances, présence d'un contaminant, mauvaise application des disques à la surface de la gélose, utilisation du milieu inapproprié...etc.

L'azote total

La méthode Kjeldahl est la technique la plus universelle pour l'analyse de l'azote, elle est utilisée pour mesurer la teneur en azote d'échantillons très diversifiés.

Dans cette étude, le taux d'azote total est mesuré dans chaque souche bactérienne identifiée. L'ensemble des résultats montre que chez les entérobactéries, le taux d'azote est compris entre 0.02% et 0.05% donc les valeurs se rapprochent. Pour les *Pseudomonas*, la teneur en azote est comprise entre 0.05% et 0.07%.

En comparant le taux d'azote total chez les Entérobactéries avec celui des *Pseudomonas*, nous remarquons qu'il s'agit d'une différence non significative, donc nous pouvons déduire que ce caractère est considéré comme étant un caractère mineur qui ne permet pas une bonne identification.

La phylogénie

L'analyse numérique des résultats obtenus grâce à l'approche bioinformatique (en utilisant la méthode de construction des arbres phylogénétiques NJ) est basée sur :

- Les tests biochimiques.
- Le profil de résistance/sensibilité aux antibiotiques.
- Le taux d'azote total de chaque espèce bactérienne identifiée.

Le calcul du coefficient de Jaccard est basé sur 28 caractères utilisés dans notre étude qui restent insuffisants pour pouvoir aboutir à une identification précise de l'espèce, car le principe de base de la taxonomie numérique consiste à comparer sur un plus grand nombre de caractères.

La construction phylogénétique par l'algorithme NJ a aboutit à un arbre non raciné. Cette construction

phylogénétique qui concerne les bactéries à Gram négatif comprenant les deux familles : *Enterobacteriaceae*, et *Pseudomonadaceae* a révélé quatre regroupements : trois font partie des entérobactéries et le quatrième fait partie des *Pseudomonas* dont *Pseudomonas aeruginosa*.

Le clade regroupant les deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens* montre que cette dernière est éloignée de *Pseudomonas aeruginosa* 1 (PS1) par une distance de : $0,070 + 0,166 + 0,158 = 0,394$. La liaison de *Serratia marcescens* avec *Pseudomonas aeruginosa* est inacceptable du fait qu'elles appartiennent à deux familles différentes.

Sur la topologie NJ, nous constatons que les deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonadaceae*) sont mal placées, elles font partie du même clade que : *Klebsiella pneumoniae1*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae2* (*Enterobacteriaceae*).

Le clade comprenant les deux souches d'*Escherichia coli* (EC2, EC4) montre qu'elles sont séparées par une distance de $0.051 + 0.088 = 0.139$. La liaison de (EC2 avec EC4) est acceptable du fait que les deux souches font partie de la même espèce.

L'établissement d'un profil phylogénétique basé sur les cinq séquences de l'ADN 16S, relevées sur la banque génomique EMBL qui représentent les espèces étudiées, nous a permis de faire une étude comparative.

Cette analyse phylogénétique a aboutit à la construction d'un arbre phylogénétique, dans le quel nous distinguons deux groupes distincts séparés par une distance de : $0.092 + 0.039 = 0.131$.

- Groupe 1 : *Pseudomonas aeruginosa*.
- Groupe 2 : Reste des clades (Entérobactéries).

Au sein du groupe 2, nous constatons que *Serratia marcescens* se place dans la même branche phylogénétique qu'*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, et occupe une ligne phylogénétique commune avec l'espèce *Escherichia coli* dont elles sont séparées par une faible distance ($0.016 + 0.013 = 0.029$).

Cependant, *Serratia marcescens* reste proche d'*Escherichia coli* dans l'arbre construit à partir des séquences d'ADN 16S, mais elles sont éloignées dans le cas de l'arbre NJ.

En comparant les deux arbres obtenus (moléculaire et NJ) il ressort que dans l'arbre NJ, certaines souches n'ont pas conservé leur place cladistique. En fin, l'analyse

phylogénétique représentée par les différents dendrogrammes démontre la grande complexité à trancher pour une phylogénie définitive.

La classification bactérienne diffère selon les variations des comportements des souches pour des raisons d'adaptation avec les contraintes de l'environnement et les conditions de vie, ce qui aboutit à des interrelations phylogénétiques différentes.

Il ressort que l'information apportée par l'analyse des caractères biochimiques ne peut en aucun cas être une référence pour aboutir à des conclusions précises de systématique bactérienne, car en systématique bactérienne, l'identification des espèces est un aboutissement d'un mélange d'approches taxonomiques qu'il faut manipuler avec prudence. (Taxonomie polyphasique).

Nous recommandons donc l'utilisation d'autres techniques et d'autres outils pour l'identification des espèces comme les techniques d'analyses chimiques (structures membranaires et organelles), moléculaires (l'hybridation ADN-ADN, microsatellites, RFLP,...), et immunologiques (les antigènes de surface), en plus l'analyse basée sur la morphologie, la biochimie, et la physiologie, pour mieux refléter les relations phylogénétiques.

CONCLUSION

Cette étude qui a fait appel à des techniques biochimiques a permis d'identifier des différentes espèces bactériennes incriminées dans les infections humaines, d'établir leur profil de résistance/sensibilité vis à vis des antibiotiques couramment utilisés, et l'établissement d'un profil phylogénétique en utilisant l'approche de modélisation bioinformatique.

Au terme de ce travail, il ressort que le phénotype biochimique présente certaines limites dans l'identification bactérienne et que l'analyse des séquences de l'ADN 16S est un outil important dans l'identification bactérienne, puisqu'elle fournit des informations plus précises sur l'emplacement phylogénétique des espèces.

Enfin, au point de vue perspective, nous insistons sur l'élaboration d'une approche plus fiable pour permettre aux laboratoires de santé de suivre une démarche simple, cohérente pour une bonne identification des différentes espèces bactériennes. Comme il est adéquat d'intégrer des outils moléculaires et bioinformatiques pour une phylogénie plus précise et plus fiable pour une systématique plus approfondie.

REFERENCES

- [1] Weber P., Dib C., Durand C. (2005). Evaluation de la sensibilité à la lévofloxacine des souches isolées d'infections urinaires basses communautaires. *Pathol Biol.* **53** : 8-125.
- [2] Les recommandations du comité de l'antibiogramme (CA-SFM). (2010). [En ligne] <http://www.sfm.asso.fr>
- [3] Kjeldahl J. (1883). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs. In organischen Körpern. *Z. Anal. Chem.* **22**: 366-382.
- [4] <http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>
- [5] Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., et al. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore. 787 p.
- [6] Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., et al. (2003). *Microbiologie*. 2^{ème} édition. Boeck Université. 1099 p.
- [7] Joffin J.N., Leyrol G. (2006). *Microbiologie technique*. Tome1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. 363 p.
- [8] Pilet C., Bourdon J.L., Toma B., et al. (1979). *Les entérobactéries : Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne*. Doins. Paris. p.109-187.
- [9] Davis J.A., Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B., Brousse J.H., Gustafson J., et al. (2011). Anatomical distribution and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from healthy companion animals. *Journal of Applied Microbiology*. **110** (2) : 597-604.
- [10] Ferjani A., Mkaddemi H., Tilouche S., Marzouk M., Hannechi N., Boughammoura L., et al. (2011). Caractéristiques épidémiologiques et bactériologiques des bactéries uropathogènes isolées dans un milieu pédiatrique. *Archives de Pédiatrie*. **18** (2) : 230-234.
- [11] Barker I.K., Allen S.E., Boerlin P., Janecko N., Lumsden J.S., Pearl D.L., et al. (2010). Antimicrobial Resistance in Generic *Escherichia coli* Isolates from Wild Small Mammals Living in Swine Farm, Residential, Landfill, and Natural Environments in Southern Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*. **77** : 882-888.
- [12] Avril J-L., Dabernat H., Denis F. et al. (2000). *Bactériologie Clinique*. Ellipses. 601 p.
- [13] Susana S., Bostjan J., Roman J., Ignacio M., Mirian F., José L., et al. (2011). Structural Features Governing the Activity of Lactoferricin-Derived Peptides That Act in Synergy with Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **55** (1) : 218-228.