

## **Chapitre 3 :**

### **Principaux types de classification**

La taxonomie bactérienne moderne vise l'intégration de toutes les données et les informations phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques menant à une taxonomie polyphasique et une classification plus stable.

#### **1-Taxonomie phénotypique**

L'identification de l'espèce repose sur la comparaison de divers caractères phénotypiques de la souche à étudier vis à vis de ceux d'une souche de référence. La classification phénétique utilise un faible nombre de caractères considérés comme importants tels que la morphologie, la mise en évidence d'un caractère biochimique, l'habitat. Mais elle ne reflète qu'un nombre réduit d'information.

#### **1-1-Caractéristiques morphologiques**

Les traits morphologiques sont importants en taxonomie microbienne pour de nombreuses raisons ;

- ✓ La morphologie est facile à étudier et à analyser
- ✓ Les caractères morphologiques sont utiles pour orienter le processus d'identification des bactéries. On peut ainsi distinguer les bactéries d'après leur forme, leur groupement et leur taille.

#### **1-2-Caractères tinctoriaux : la coloration différentielle**

En mettant en évidence les similitudes ou les différences dans la composition de la paroi cellulaire des microorganismes étudiés fournissent des informations à propos des relations phylogénétiques. La coloration différentielle est l'une des premières étapes de processus d'identification d'une bactérie. La majorité des bactéries sont soit gram positif, soit Gram négatif.

### **1-3-Caractéristiques physiologiques et métaboliques**

Les caractéristiques physiologiques et métaboliques sont très utiles, car elles sont directement en relation avec la nature et l'activité des enzymes microbiennes. Parmi les caractères physiologiques et métaboliques utilisées pour la classification et l'identification on peut citer:

- Sources de carbone et d'azote
- Constituants de la paroi cellulaire
- Produits de fermentation
- Mode générale de nutrition
- domaine de température de croissance
- Luminescence
- Mécanismes de conversion de l'énergie
- Mobilité
- Tolérance osmotique
- Pigments photosynthétiques
- Besoins et tolérance en sel
- Métabolites secondaires formés
- Sensibilité aux inhibiteurs métaboliques et aux antibiotiques
- Inclusions de réserves

### **1-4-Caractéristiques biochimiques**

L'activité enzymatique sert souvent à différencier des bactéries. Il est généralement possible de distinguer des bactéries étroitement apparentées et de les regrouper en des espèces distinctes au moyen d'épreuves biochimiques, comme celle qu'on utilise pour déterminer leur capacité à provoquer la fermentation d'une gamme donnée de glucides (Figure 3).

Du point de vue médical, les épreuves biochimiques constituent une étape cruciale dans le processus d'identification des bactéries pathogènes de manière que le médecin puisse entreprendre le traitement approprié par exemple, tous les genres de la famille des *Enterobacteriaceæ* ont la propriété commune de ne pas produire d'oxydase.

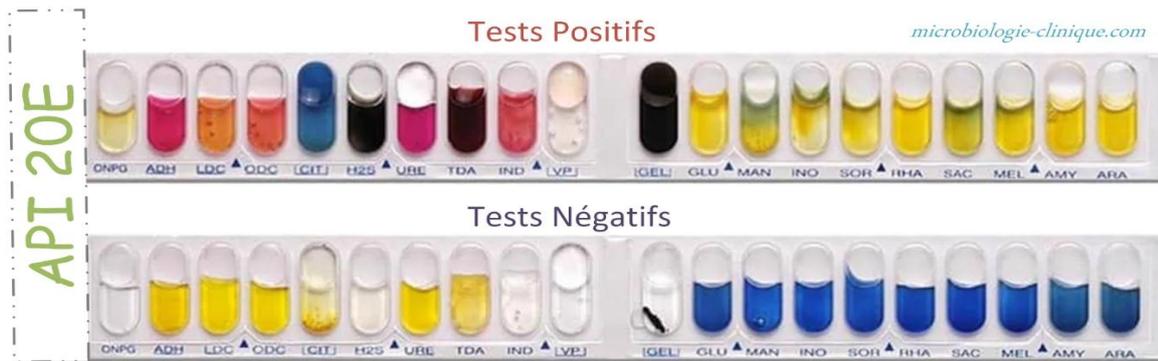


Figure 3 : Galerie biochimique Api 20 E

### 1-5-Caractéristiques écologiques

La capacité d'un micro-organisme de coloniser un environnement spécifique a une valeur taxinomique. Certains micro-organismes peuvent être très similaires sous beaucoup d'autres aspects, mais habiter des niches écologiques différentes, ce qui suggère qu'ils ne sont peut-être pas aussi proches qu'on le supposait initialement. Comme exemples de propriétés écologiques taxinomiquement importantes, citons les modèles de cycles biologiques, la capacité de causer une maladie chez un hôte particulier, les préférences d'habitat telles les exigences de température, de pH, d'oxygène et de concentration osmotique.

### 1-6-Caractères sérologiques

La sérologie est la science qui étudie le sérum sanguin et les réponses immunitaires mises en évidence par l'examen du sérum. Des solutions d'anticorps (**antisérum** ou **immunosérum**) destinées à l'identification de divers microorganismes important d'un point de vue médical sont disponibles sur le marché. Une bactérie inconnue isolée d'un patient est souvent rapidement identifiée à l'aide d'antisérum connus.

Les épreuves sérologiques permettent de différencier non seulement des espèces de microorganismes, mais aussi des souches d'une même espèce. Les souches possédant différents antigènes sont appelées sérotypes ou sérovars.

Le test d'agglutination sur lame avec l'antisérum est une procédure qui consiste à incorporer des échantillons d'une bactérie inconnue dans des gouttes de solution saline (eau physiologique) placées sur différentes lame. On ajoute ensuite un antisérum différent à chaque échantillon. Les bactéries s'agglutinent (ou forment des grumeaux) lorsqu'elles sont mélangées aux anticorps spécifiquement produits en réaction à cette espèce ou souche de bactérie ; l'agglutination indique que l'épreuve est positive.

### **1.7-La lysotypie**

La lysotypie sert à révéler les similitudes entre les bactéries, Il s'agit d'une épreuve destinée à identifier les phages auxquels une bactérie est sensible. Les bactériophages (ou phages) sont des virus qui infectent les bactéries, dont ils provoquent généralement la lyse. La lysotypie se fonde sur le fait que les phages sont très spécialisés, en ce sens qu'ils n'infectent le plus souvent que les membres d'une espèce donnée, ou même de souches données d'une espèce. Une souche bactérienne peut être sensible à deux phages distincts, tandis qu'une autre souche de la même espèce est sensible aux deux mêmes phages, et aussi à un troisième.

Le test de lysotypie consiste à faire d'abord croître des bactéries sur toute la surface d'une boîte de Pétri contenant de la gélose, des gouttes de différentes solutions contenant chacune l'un des phages à étudier sont ensuite placées sur les bactéries. La formation des zones pâles ou plages de lyse (là où la croissance des bactéries est inhibée) indique leur lyse par les phages (Figure 4).

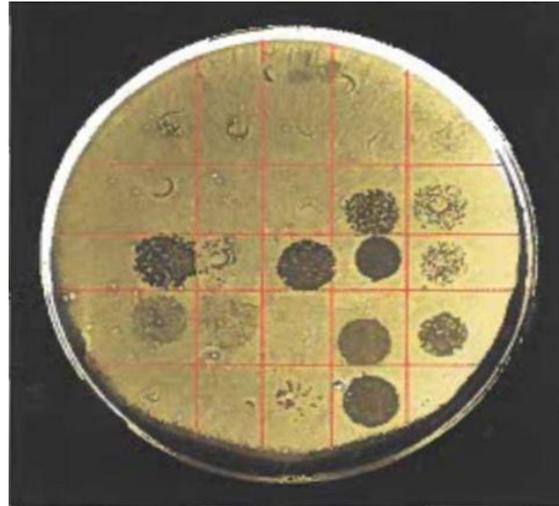


Figure 4: Lysotypie d'une souche de *Salmonella enterica*

### 1-8-La Chimiotaxonomie

Le terme chimiotaxonomie décrit la classification des bactéries sur la base de leur constitution chimique. Il s'agit de l'analyse physico-chimique des cellules bactériennes ou de leurs composants.

- **Composition de la paroi cellulaire** Différencier qualitativement les bactéries sur la base de leur paroi cellulaire demande l'analyse microscopique à transmission et l'analyse de la composition des différents polymères : peptidoglycanes, polysaccharides, lipopolysaccharides, acides techoïques.
- **Composition lipidique** à partir de la structure de base des lipides, on peut distinguer les Archae de tous les autres organismes ; en effet leurs lipides contiennent des chaînes latérales isoprénoides avec des liaisons éther (isoprényl-glycerol-ether) à la différence des autres organismes (eucaryotes) à chaînes hydrocarbures avec liaison type ester. Les lipides eubactériens comprennent de nombreuses et différentes classes dont quelques-unes ont un potentiel chimiotaxonomique à l'exemple des glycolipides moins répartis que les phospholipides.
- **Quinones isoprénoidiques**  
Les quinones isoprénoides sont une classe de terpènes localisés dans la membrane cytoplasmique de nombreuses bactéries. Elles jouent un

rôle important dans le transport des électrons, la phosphorylation oxydative et éventuellement dans le transport actif.

- **Les acides aminés et les protéines**

La comparaison des séquences d'acides aminés des différents types de protéines entre différentes souches est utilisée comme référence pour les mesures phylogénétiques entre microorganismes.

Les séquences en acides aminés des protéines reflètent directement les séquences des ARNm et par conséquent, les gènes qui codent pour leur synthèse.

Il y a plusieurs façons de comparer des protéines. Les méthodes indirectes de comparaison des protéines sont d'usage courant. En particulier, la mobilité électrophorétique des protéines est utile pour étudier les relations au niveau de l'espèce et de la sous espèce. Les profils issus par l'électrophorèse SDS-PAGE ont indiqué que les différentes souches possèdent différents profils mais les souches qui appartiennent à la même espèce ont des profils semblables.

### **1-9-Taxonomie numérique**

La taxinomie numérique ou taxométrie est une approche quantitative basée sur la comparaison de caractères de différentes natures : morphologiques, physiologique, génétiques appartenant à des souches prises deux à deux. Les caractères retenus sont considérés d'égale valeur et sont quantifiés numériquement, de manière à établir des distances taxonomiques qui traduisent à la fois la similarité (ressemblance) et les rapports d'ascendance évolutive (parenté, filiation) entre les organismes confrontés.

La quantification binaire (0 ou 1, c'est présence) des similitudes et des différences permet alors de caractériser coefficient de similitude, calculé de diverses manières, selon le choix des caractères sélectionnés et le codage et le traitement appliqués aux données recueillies. Parmi les indices les plus couramment utilisés, l'indice de Jaccard Sneath donnée par la relation :

$$S_{AB} = nS^+ / nS^+ + nd$$

**SAB** : Coefficient de similitude entre la souche A et la souche B

**nS<sup>+</sup>** : Nombre de caractère similaires

**nd** : Nombre de caractères différents pour donner une valeur significative à l'étude.

La taxonomie numérique implique le choix de caractères taxonomiques indépendants les uns des autres, Le nombre de caractère retenus doit être significatif, il se situe entre 30 et 300 caractères qui peuvent être de diverses natures : paramètres génomiques, caractères phénétiques classiques (morphologie, physiologie, structure, métabolisme), composants chimiques (peptidoglycane, LPS...).

Les résultats de l'analyse taxonomique numérique sont souvent exprimés sous la forme d'un diagramme ramifié analogue à un arbre. C'est un dendrogramme ou les organismes ayant la plus grande similitude sont groupés en ensembles appelés phénons. En général, on estime qu'au-delà de 80% de similitude des phénons peuvent être assimilés à une même espèce.

Cette méthode, qui nécessite de nombreux calculs, a grandement bénéficié des outils informatiques qui en rendu l'utilisation plus accessible.

## **2-Taxonomie moléculaire**

### **2-1-La composition en bases des acides nucléiques**

Les génomes microbiens peuvent être directement comparés et leur similarité taxinomique estimée de nombreuses façons. La première et probablement la plus simple des techniques consistent à déterminer la composition en bases de l'ADN.

La composition des bases s'exprime généralement sous la forme du pourcentage de guanine et de cytosine (G + C). En théorie, le pourcentage de bases d'ADN qui sont des paires GC indique également le pourcentage de bases qui sont des paires AT (car  $GC + AT = 100\%$ ). Si deux organismes sont étroitement apparentés, c'est à dire s'ils ont en commun de nombreux gènes identiques ou similaires, leur ADN renfermera à peu près les mêmes

quantités des différentes bases. Toutefois, si la différence des pourcentages de paires G + C est supérieure à 10% (par exemple, l'ADN d'une bactérie contient 40% de G + C, tandis que l'ADN d'une seconde bactérie en contient 60%), les deux organismes ne sont probablement pas apparentés. Il est clair que, même si deux organismes ont un pourcentage de G + C équivalent, cela ne signifie pas qu'ils soient étroitement apparentés; ce fait doit être étayé par d'autres données pour qu'on puisse en tirer des conclusions sur une relation phylogénétique.

## **2-2-L'hybridation des acides nucléiques**

La similarité entre génomes peut se comparer plus directement par l'hybridation des acides nucléiques, appelée aussi hybridation ADN-ADN.

Le fait de soumettre une molécule d'ADN double brin à la chaleur entraîne la séparation des brins complémentaires par rupture des liaisons hydrogène entre les bases. Si on refroidit ensuite les brins simples lentement, ils se regroupent pour former une molécule double brin identique à la molécule originale. Cette réunion est possible à cause de la complémentarité séquentielle des brins simples.

En appliquant cette technique à des brins d'ADN séparés qui proviennent de deux organismes différents, on peut déterminer à quel point les séquences de bases se ressemblent. Cette méthode, appelée **hybridation moléculaire**, est fondée sur l'hypothèse que, si deux espèces sont similaires ou apparentées, une bonne partie des séquences des nucléotides sont semblables. Elle permet de mesurer la capacité des brins d'ADN d'un organisme à s'hybrider (à s'unir par appariement de bases complémentaires) avec des brins d'ADN d'un autre organisme. Le degré d'hybridation est d'autant plus élevé que les deux organismes sont apparentés.

L'hybridation ADN-ADN n'est utilisée que pour l'étude de microorganismes étroitement apparentés. On peut comparer des organismes plus distants, en réalisant des hybridations ADN-ARN avec des ARN ribosomiques ou de transfert, radioactif.

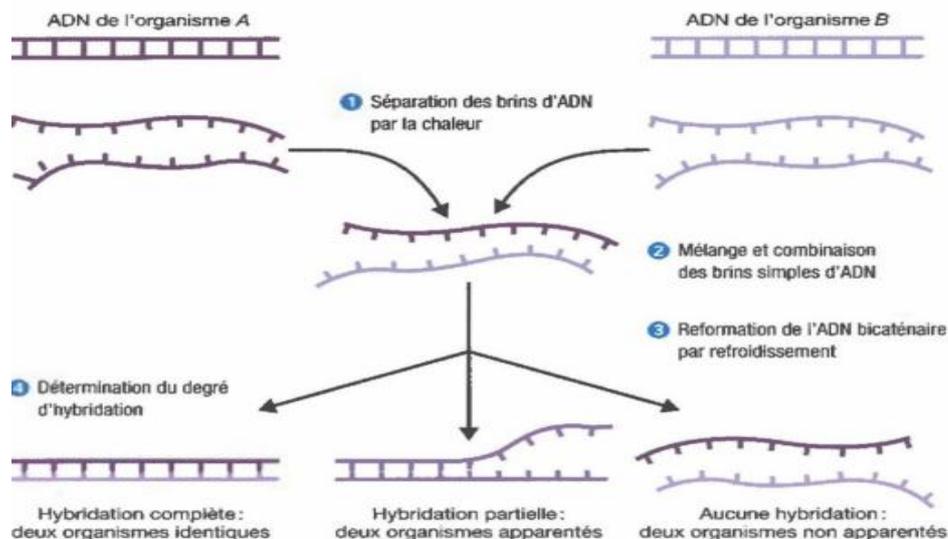


Figure 5 : Hybridation ADN-ADN

### 2-3-Le séquençage des acides nucléiques

Les ARNr de la petite sous unité sont un outil presque idéal pour l'étude de l'évolution et de parentés microbiennes, car ils jouent le même rôle chez tous les microorganismes. Les ARNr ont été choisis en taxonomie pour plusieurs raisons évidentes :

- Molécule ubiquiste
- Structure bien conservée car toute modification pourrait nuire à la synthèse protéique
- Séquences d'ARNr identiques chez tous les êtres vivants
- Abondants dans la cellule et donc facilement purifiables.

La stabilité des ARNr est mise à profit pour analyser les relations des bactéries au niveau de l'espèce et à des niveaux hiérarchiques plus élevés. On distingue trois types d'ARNr (**23S** qui comporte 2900 nucléotides, **16S** avec 1540 nucléotides et le **5S** avec 120 nucléotides) L'ARNr 16S est le plus utilisé.

L'ARNr 16S est utile à la classification phylogénétique et à l'identification bactérienne puisqu'il est présent dans toutes les bactéries. Il comporte des séquences conservées (stables) communes à des unités de taxons élevés et

des séquences variables spécifiques d'espèces. La séquence nucléotidique de l'ARNr 16S peut être comparée via internet à celles de souches déposées dans des banques de données internationales. La tendance actuelle est de travailler sur le gène correspondant. La séquence du gène codant l'ARNr 16S est connue pour environ 4000 souches et c'est accessible par interrogation de bases de données (EMBL, GenBank). Les programmes FASTA et BLAST permettent de comparer une séquence nucléotidique d'une souche inconnue avec les banques de séquence et retiennent les séquences les plus proches.

Il est admis qu'en dessous de 97% d'homologie deux bactéries ne peuvent appartenir à la même espèce. Ainsi, il n'est donc pas utile de faire des hybridations ADN/ADN en dessous de ce seuil. Si le pourcentage d'homologie est > 97%, le placement de 2 souches dans une même espèce ou pas repose sur les résultats de l'hybridation ADN/ADN.

Limites : deux espèces peuvent avoir des séquences ARNr 16S très proches et être cependant très différentes par hybridation ADN/ADN. Exemple : *Aeromonas trota* et *A. caviae* (99.9% de similitude pour ARNr 16S et 30% de similitude pour l'hybridation ADN/ADN).

### **2-4-La prise d'empreinte génomiques**

Pour classer les microorganismes au niveau de l'espèce et aider à déterminer les relations phylogénétiques, on peut aussi utiliser un ensemble de techniques, appelé prise d'empreintes génomiques « fingerprinting ». Souvent, on séquence et on compare de cinq à sept gènes domestiques, via une technique appelée analyse de séquence multilocus (MLSA).

Une autre forme de prise d'empreinte génomiques appelée l'analyse du polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) est basée sur le pouvoir qu'ont les endonucléases de restriction de reconnaître des séquences de nucléotides spécifiques. L'analyse RFLP détecte des changements dans la taille des fragments de restriction (polymorphisme) comme moyen de détecter des différences dans les séquences d'ADN des souches microbiennes.

### **3-Taxonomie phylogénétique**

La Phylogénie (*Phylo* = race ou tribu, *genesis* = origine) ; C'est un système de classification basé sur les relations évolutives plutôt que sur une similarité générale des caractères.

La classification phylogénétique est basée sur les rapports héréditaires entre les bactéries encodés par les données des séquences de l'ARNr 16S ou 23S.

Le concept phylogénétique d'une espèce bactérienne est considéré comme un assemblage des isolats d'origine commune, et la génération de la diversité génétique est résultée dans un clone avec différents degré de recombinaison, et caractérisée par un certain degré de consistance phénotypique et un degré significatif d'hybridation ADN-ADN et en plus de 97% d'homologie des séquences d'ADNr 16S.

Les taxons microbiens au sein des bacteria et des Archaea s, forment des groupes distincts agglomérés de façon généalogique qui peuvent être illustrés sous forment d'arbres phylogénétiques.

Les arbres phylogénétiques montrent les liens évolutifs déduits par l'analyse sous forme de lignées aux multiples branches reliées par des nœuds. L'organisme dont les séquences (acides nucléiques, protéines) ont été analysé est identifié à la pointe de chaque branche. Chaque nœud (ramification) représente un évènement où une divergence s'est produite, et la longueur des branches représente le nombre de changements moléculaires qui se sont produits entre les deux nœuds.

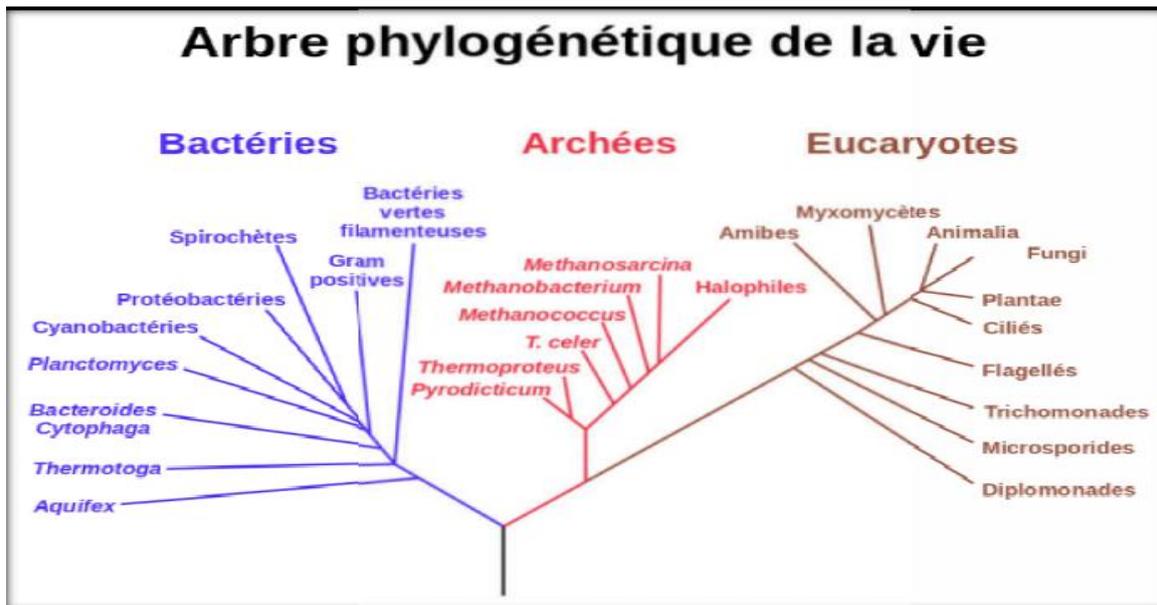


Figure 6 : Arbre phylogénétique du monde vivant d'après Woese *et al.* (1990)