Chapitre 2 : Principaux types de classification

1-Les systèmes de classification :

Il existe deux grands types de classifications : artificielle ou naturelle.

1-1-Classification artificielle : basée sur une clé qui regroupe un ensemble de bactéries partageant une même propriété phénétique : **physiologique** ou **métabolique**, facilement reconnaissable par sa présence **(+)** ou son absence **(-)**.Ce type de taxonomie est d'un grand intérêt pratique puisqu'il limite à priori le champ d'investigation aux seules bactéries partageant la propriété discriminante.

Cette classification vient du fait que les bactériologistes n'ont pas tous la même approche de la microbiologie (médicale, agroalimentaire, biotech, fondamental, ...). Chaque domaine est tenté d'utiliser ses propres critères pour faire de la classification ce qui implique que certaines bactéries peuvent avoir différents noms. Exp: *Erwinia hubicola* (saprophyte des plantes) = *Enterobacter agglomerans* (bactérie intestinale) ou encore *Bacillus cereus* = *Bacillus thurengiensis.*

1-2- Classification naturelle : Les microorganismes sont classés avec un maximum de critères sans les hiérarchiser les uns par rapport aux autres. Il existe deux approches (méthodes) différentes: classification phénotypique qui regroupe les organismes suivant la similitude de leurs caractères phénotypiques, la classification phylogénétique Groupe les organismes selon des relations évolutives, elle utilise des caractères génétiques Elle est Basée sur les marqueurs moléculaires pour leur grande stabilité évolutive.

2-Principaux types de classifications :

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.

2-1-Classification phénotypique :

C'est la classification la plus anciennement employé par les taxonomistes microbiens. Elle regroupe les organismes suivant la similitude de leurs caractères phénotypiques. Les méthodes phénotypiques comprennent toutes les techniques reposant sur la détermination de caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries via des techniques standardisées.

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. Les tests sont basés soit sur les critères classiques ou traditionnels utilisés dans les schémas d'identification pratiqués dans la plupart des laboratoires de microbiologie, soit sur des tests spécialisés réservés à certains laboratoires.

❖ **Caractéristiques morphologiques :**

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

- ✓ L'aspect des colonies observées sur la boîte de culture permet dans certains cas d'orienter l'identification vers un groupe de bactéries. La taille, la forme, la couleur…, l'odeur éventuelle ainsi que la présence et le type d'hémolyse sur gélose au sang constituent des critères orientatifs d'identification.
- ✓ L'examen microscopique fournit les renseignements concernant la morphologie des bactéries (cocci, bacilles, spiralées, à bords parallèles ou non, à extrémités arrondies ou effilées …) ainsi que leur taille. La coloration de Gram permettra de les classer en bactéries à Gram positif ou à Gram négatif ainsi que d'observer des arrangements particuliers (diplocoques, palissades, chaînettes, …).

❖ **Caractéristiques physiologiques et métaboliques :**

L'identification bactérienne repose sur la détermination des sources de carbone, d'énergie et d'azote, les profils d'oxydation ou de fermentation des substrats carbonés (oxydatif ou fermentatif), l'utilisation des acides organiques, la production d'enzymes diverses et/ou de gaz, la sensibilité à certains inhibiteurs métaboliques ou aux antibiotiques, les conditions de croissance, les exigences en CO_2…

Certains critères sont plus facilement et rapidement accessibles que d'autres comme par exemple la recherche d'une catalase ou d'une oxydase sur une culture ainsi que la mise en évidence de l'utilisation de divers sucres ou substrats ou du métabolisme respiratoire en utilisant des milieux appropriés.

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.

❖ **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.

❖ **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 pas les phages.

❖ **Caractères Chimio-taxonomiques :**

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 ;**

la composition de la paroi cellulaire peut être déterminée dans un but taxonomique. En effet, bien qu'ayant une partie glucidique très conservée entre les différents microorganismes, le peptidoglycane présente une grande variabilité structurale. La détermination de sa

composition est surtout utilisée pour les bactéries à Gram positif chez lesquelles elle peut être caractéristique d'un genre ou d'une espèce bactérienne particulière. Le type de peptidoglycane chez les bactéries à Gram négatif est plutôt uniforme et ne présente que peu d'intérêt taxonomique.

Les acides teichoïques enchâssés dans ce peptidoglycane peuvent également être utilisés en tant que marqueurs phénotypiques après extraction, purification et analyse par chromatographie Leur absence chez *Micrococcus spp*. Permet de distinguer ces bactéries des *Staphylococcus spp*. Au sein de ce genre, le type d'acide teichoïque permet de différencier *Staphylococcus aureus* des autres espèces de *staphylocoques.*

- ✓ **Composition lipidique ;**

Les acides gras sont les composants majoritaires des lipides cellulaires. La caractérisation des types et des proportions d'acides gras présents dans les membranes bactériennes est utilisée par certains laboratoires pour identifier les bactéries En effet, la composition en acides gras des procaryotes peut être très variable, que ce soit au niveau de la longueur des chaînes d'acides gras ou de la présence ou non de doubles liaisons, de noyaux aromatiques, de chaînes ramifiées ou de groupements hydroxyles.

Un profil d'acide gras peut donc être caractéristique d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Ainsi les *Lactobacillus spp*. Ont des acides gras à nombre pair d'atomes de carbone et à courte chaîne droite alors que les espèces du genre *Bacillus* ont des acides gras à nombre impair de carbones et à chaîne ramifiée.

La détermination de ces profils est effectuée par la technique **FAME (pour Fatty Acid Methyl Ester**).

- ✓ **Détermination des profils protéiques**

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. En particulier, la **mobilité éléctrophorétique des protéines** qui est utile pour étudier les relations au niveau de l'espèce et de la sous espèce.

Les profils issus par l'électrophorèse **SDS-PAGE** (pour sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis), ont indiqué que les différentes souches possèdent

différents profils mais les souches qui appartiennent à la même espèce ont des profils semblables.

2-2 Classification numérique :

Cette approche taxonomique a été proposée en 1957, elle est devenue possible grâce à l'invention de l'outil informatique d'où son nom taxonomie numérique.

La méthode consiste à étudier, pour chaque souche, tous les caractères possibles, il s'agit de centaines de caractères (Le nombre de caractères étudié varie entre 30 et 300)**.** Morphologiques, biochimiques, culturaux, structuraux...etc. Ces caractères sont ensuite codés **1** (présence du caractère) ou **0** (absence du caractère). Le but recherché est de rassembler dans une classe de similitude les individus les plus semblables afin d'évaluer la ressemblance entre les souches en calculant **un indice numérique (coefficient de similitude ou distance taxonomique)**, ces calculs sont effectués avec un ordinateur, les bactéries étudiées sont ensuite regroupées en taxons en se basant sur des pourcentages de similitude fixés par le taxonomiste.

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

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

nS^{+} : Nombre de caractère similaires

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

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.

2-3 Classification moléculaire (génotypique) :

Les génomes microbiens peuvent être directement comparés et leur similarité taxinomique estimée de nombreuses façons.

- ✓ **Mesure du contenu en guanine et cytosine :**

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).** Selon Chargaff *et al.* (1949), le contenu des bases

puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN peut varier d'un individu à un autre mais il est toujours constant chez les individus d'une même espèce**.**

on admet que les bactéries dont le GC% diffèrent de plus de 5 % ne peuvent appartenir à la même espèce et que les bactéries dont les GC diffèrent de plus de 10% ne peuvent appartenir au même genre. 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. 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.

- ✓ **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.

Des valeurs d'hybridation au moins égales à **70%** sont recommandées pour considérer que deux isolats appartiennent à la même espèce et des valeurs supérieures à **25%** d'hybridation sont nécessaires pour affirmer que ces isolats peuvent être placés dans le même genre.

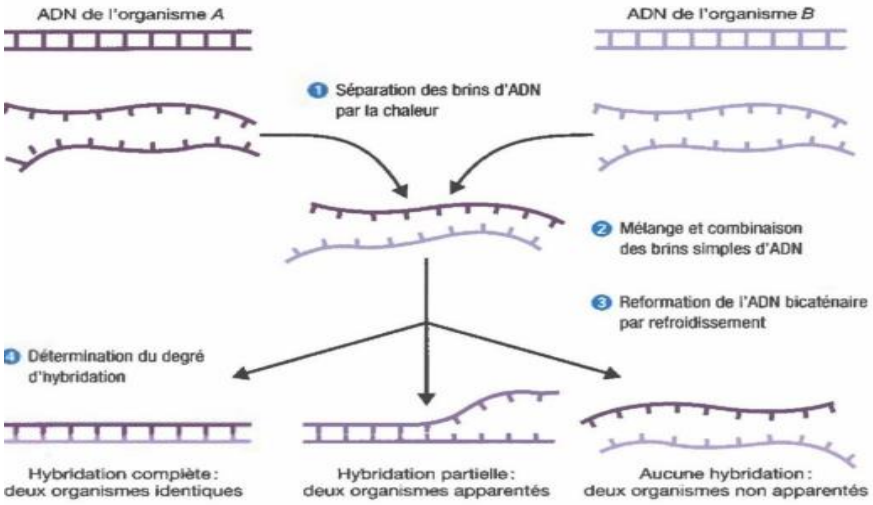

Figure 2 : Hybridation ADN-ADN

✓ **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.

Les ARNr sont associés à des protéines pour former les ribosomes, ces derniers sont composés de deux sous unités. Un ribosome bactérien contient une sous unité 30S et une sous unité 50S, la sous unité 30S contient de l'ARNr 16S et la sous unité 50S contient de l'ARNr 5S et de l'ARNr 23S. L'ARNr 5S est formé d'environ 120 nucléotides, l'ARNr 16S de 1500 nucléotides et l'ARNr 23S comprend environ 2900 nucléotides. Les ARNr sont utilisés pour analyser les relations taxonomiques des bactéries au niveau de l'espèce et à des taxons plus élevés, l'ARNr 16S est plus facile à analyser que l'ARN 23S et plus riche en information que l'ARNr 5S, c'est pour cette raison qu'il est le plus utilisé dans la taxonomie bactérienne. Il contient des régions conservées (constantes) et identiques pour toutes les bactéries et des régions variables, les régions variables sont très importantes car c'est grâce à elles que les

bactéries sont classées en taxons, à chaque taxon correspondra une séquence particulière au niveau de ces régions. Les régions conservées étant identiques chez toutes les bactéries

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. 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.

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

2-4-Classification 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. 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 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.