

Chapitre 1 : introduction à la systématique

La liste des microorganismes est si importante qu'il est apparu nécessaire voir même impératif de leur attribuer un nom (nomenclature) et de les classer.

1. La taxonomie

Les organismes vivants sont étonnamment divers et il est nécessaire de les classer ou de les arranger en groupes selon leurs similitudes mutuelles. La taxinomie ou la taxonomie (taxi= arrangement, ordre ; nomis= lois) se définit comme la science de la classification biologique. Elle est généralement prise comme synonyme du systématique ou du biosystématique. Au sens large, elle est faite de trois parties séparés ; la classification, la nomenclature et l'identification.

1.1.La classification est l'arrangement des organismes en groupes ou taxons selon leur similitude ou leur parenté évolutive.

1.2.La nomenclature est la branche de la taxinomie qui s'occupe de donner des noms aux groupes taxonomiques selon les règles publiées.

Il utilise des mots latins ou latinisés qui sont traditionnellement écrits en italique ou ils sont soulignés dans un manuscrit.

• Aucun signe diacritique (á, à, â, ã, é, è, ê, ë, í, î, ï, ñ, ó, ò, ô, ö, õ, ú, ù, û, ü, ø, æ...) n'est toléré et les mots ne doivent pas contenir de trait d'union. Par exemple, on doit écrire *Bacteroides* et non *Bacteroïdes*.

• **La famille** : Le nom est fondé sur un genre valide, il est féminin, pluriel et se termine par – *aceae*

• **Le genre** : écrit en Italique. Avec sa première lettre en majuscule. Après sa citation le nom du genre est abrégé à sa première lettre. Ex : *Escherichia coli*, *Mycoplasma pneumoniae*.

• **L'espèce** : écrite en Italique (ou souligné). Avec sa première lettre en minuscule.

• **Les noms des sous-espèces** sont formés d'une combinaison ternaire commençant par le nom d'espèce suivi par l'abréviation « *subsp.* » et d'un troisième terme propre à la sous-espèce (exemple : *Streptococcus equi subsp. equi*).

1.3.L'identification est le côté pratique de la taxinomie, elle consiste à déterminer qu'un isolat particulier appartient à un taxon connu.

2. Les procaryotes

Les procaryotes sont des organismes unicellulaires dont les cellules ne possèdent pas de noyau ni d'organites membranaires internes. Ils sont généralement de petite taille et ont un mode de reproduction asexuée par division cellulaire simple (bipartition). Ils sont omniprésents dans divers environnements et jouent des rôles essentiels dans les cycles biogéochimiques et comme agents pathogènes.

Pendant longtemps, tous les procaryotes ont été classés dans un domaine unique. Mais dans les années 1970, le travail du microbiologiste Carl Woese et ses collaborateurs sur les séquences d'ARNr des cellules procaryotes démontre que ces derniers sont divisés en deux lignées distinctes: les archées et les bactéries. Aujourd'hui, ces groupes sont considérés comme formant deux des trois domaines du vivant. Le troisième domaine (Eukaryota) inclut tous les eucaryotes, comme les plantes, les animaux et les champignons.

Figure 19.3 L'ARN de la petite sous-unité ribosomique. Exemples représentatifs des structures secondaires des ARN des trois domaines principaux : Bacteria (*Escherichia coli*), Archaea (*Methanococcus vannielii*) et Eucarya (*Saccharomyces cerevisiae*).

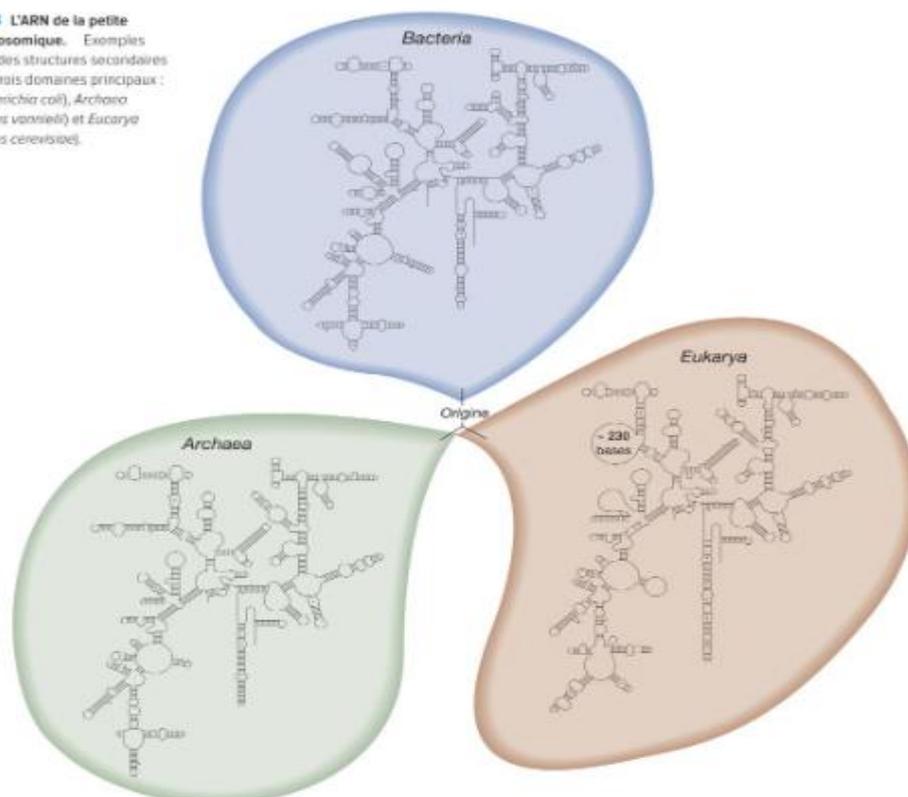


Figure n1 : La comparaison de l'ARN de la petite sous-unité ribosomique entre les trois domaines (Bactéria, Archea, Eucarya).

2.1. Eubactéries (Bactéries) : Les eubactéries, également appelées bactéries, sont un vaste groupe de procaryotes caractérisés par leur diversité métabolique et leur capacité à occuper une grande variété d'habitats. Elles peuvent être aérobies (requérant de l'oxygène) ou anaérobies (se développant en l'absence d'oxygène), et certaines sont des symbiotes, vivant en association avec d'autres organismes. Les bactéries se distinguent des archaea par leur membrane cellulaire, leur composition des parois cellulaires et leur métabolisme.

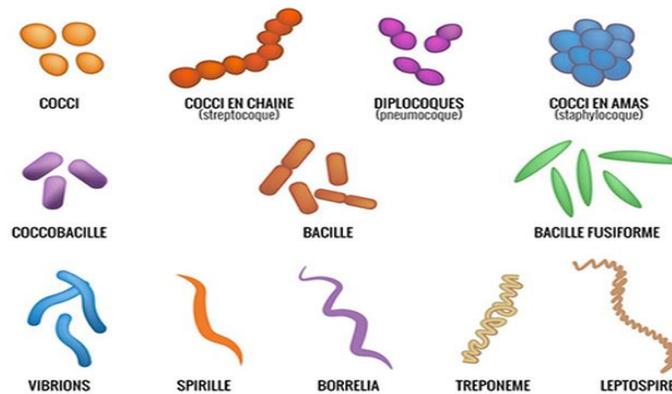


Figure n 2 : les différents types des bactéries

2.2. Archaea : Les archaea sont un groupe distinct de procaryotes qui sont souvent trouvés dans des environnements extrêmes tels que les sources hydrothermales, les marais salants, et les sols acides ou alcalins. Ils se distinguent des eubactéries par plusieurs caractéristiques moléculaires, telles que leur métabolisme unique, leur composition des membranes cellulaires et la structure de leur ADN. Les archaea comprennent des organismes méthanogènes, halophiles, thermophiles et acidophiles, qui ont adapté leurs métabolismes pour survivre dans des conditions souvent inhospitalières.

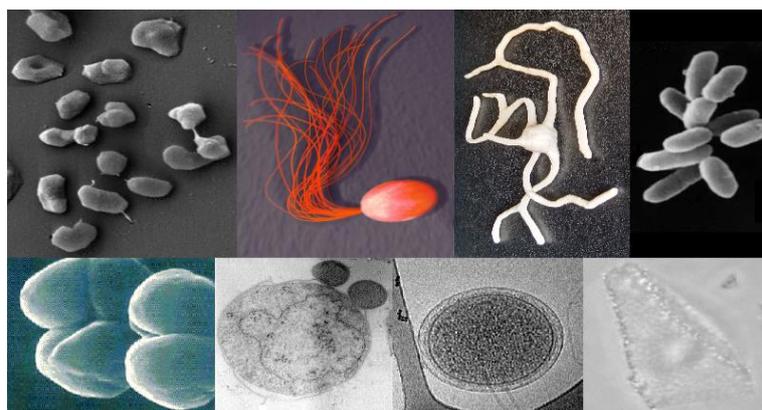


Figure n 3 : les types des Archaea

3. Les rangs taxonomiques

En préparant une classification, on place le micro-organisme à l'intérieur d'un petit groupe homogène qui est lui-même membre d'un groupe plus large dans une organisation hiérarchique et non chevauchante. Dans la taxonomie des procaryotes, les niveaux ou les rangs les plus utilisés sont par ordre ascendant, **les espèces, les genres, les familles, les ordres, les classes, les phylums**. A chaque niveau ou rang, les groupes microbiens ont des noms avec des terminaisons ou des suffixes caractéristiques de ce niveau.

Le groupe de base en taxinomie microbienne est l'espèce. La définition la plus fondamentale d'une espèce de bactérie ou d'archée est un ensemble de souches qui partagent de nombreuses propriétés stables et diffèrent de façon significative des autres groupes de souches. Un ensemble de souches de même espèce ont une teneur en GC similaire et une similarité de 70% ou plus.

Les souches à l'intérieur d'une espèce peuvent différer légèrement l'une de l'autre de multiples façons :

- Des **biovars** sont des souches variantes caractérisées par des différences biochimiques ou physiologiques,
- Les **morphovars** diffèrent morphologiquement,
- Les **sérovars** ont des propriétés antigéniques distinctives
- Les **pathovars** ont des différences pathogéniques,
- Les **zymovars** diffèrent d'isotypie des enzymes,
- Les **lysovars** diffèrent de sensibilité à des bactériophages,
- Les **antibiotypes** diffèrent de sensibilité aux antibiotiques,

Tableau N1 : des exemples des rangs taxonomiques

TAXON	Exemple 1	Exemple 2	Exemple 3
Domaine	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Listeriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Listeria</i>

4. Différentes approches taxonomiques

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.

4.1. Taxonomie phénotypique

Depuis la classification proposée par Cohn en 1872 et jusqu'au début des années soixante (60), toute la taxonomie bactérienne reposait sur une classification phénotypique (ou phénétique) qui est basée sur les caractères observables tels que la morphologie, la mise en évidence d'un caractère biochimique, l'habitat. Mais elle ne reflète qu'un nombre réduit d'information

-Observations macroscopiques, microscopiques : descriptions des colonies (forme, taille, couleur, odeur), la morphologie des cellules (bacille, coque), leurs arrangements, les colorations (GRAM, bleu méthylène, acido-alcool-résistante), observation de la mobilité à l'état frais, la présence d'endospores, la croissance aérobie, anaérobie. Les caractères morphologiques sont utiles pour l'identification, mais ne peuvent pas démontrer à eux seuls les relations phylogénétiques.

-Tests métaboliques : ils peuvent distinguer des bactéries très apparentées. La recherche d'enzymes (oxydase, catalase), la dégradation de l'urée, de l'esculine. La transformation du lactose et la production de gaz, l'utilisation de différents sucres comme source de carbone, l'utilisation du citrate, la production d'acétoïne. Ces techniques sont miniaturisées dans des galeries spécialisées (API) (on peut faire 20 tests sur une même galerie spécifique des entérobactéries).

-Méthode sérologique : le sérodiagnostic et le stéréotypage est basé sur la réaction spécifique antigène – anticorps. Cette méthode permet de différencier des espèces et même des souches au sein d'une même espèce. Les antigènes ciblés sont les Ag O chez les Gram négatives, les Ag H flagellaires et les Ag K capsulaires.

-Tests d'inhibition : on évalue la croissance des micro-organismes sur des milieux sélectifs, en présence d'antibiotiques (antibiogramme).

-Chimiotaxonomie : L'application des techniques chimiques et physiques dans l'étude de la composition chimique du milieu interne de la cellule bactérienne a contribué à fournir des informations de grande utilité aussi bien dans l'identification que dans la classification des bactéries.

On détermine le profil des acides gras des parois. Le profil des protéines totales par électrophorèse (séparation selon le pHi et le poids moléculaire).

- La lysotypie : Infection par des bactériophages et formation de plages de lyses. On définit le lysovar ou le lysotype.

4.2. Taxonomie moléculaire

-La taille du génome Selon les espèces la taille du génome est variable. Par exemple chez les bactéries paratrophes le génome est très réduit.

-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 consiste à déterminer la composition en bases de l'ADN. Dans l'ADN double brins, A s'apparie avec T et G avec C. Donc le rapport $(G+C)/(A+T)$, ou teneur en G+C le pourcentage de G+C dans l'ADN, est un reflet de la séquence en bases.

Ce coefficient est appelé coefficient de Chargaff. Il peut être calculé suite à un séquençage par la formule suivante $((G+C)/(A+T+G+C)) \times 100$. Ou bien par une méthode de spectrométrie ultra-violet.

Si deux organismes diffèrent de plus de 10% dans leur contenu en G+C, leurs génomes ont des séquences en bases très différentes.

-Hybridation des acides nucléiques La similarité entre génomes peut se comparer plus directement par l'hybridation des acides nucléiques, appelée aussi hybridation ADN-ADN. Deux souches dont les ADN accusent une parenté d'au moins 70 % dans les conditions optimales d'hybridation et moins de 5% de différence de T_m , sont souvent, mais pas toujours, considérées comme des membres de la même espèce. Si des molécules d'ADN ont des séquences très différentes, elles ne formeront pas d'hybrides stables détectables. Par conséquent, l'hybridation ADN-ADN n'est utilisée que pour l'étude de microorganismes étroitement apparentés.

-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. 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 comparé 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 connu pour environ 4000 souches et 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.

L'amplification par PCR présente un intérêt pour le diagnostic de bactéries non cultivées.

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. Ex : *Aeromonas trota* et *A. caviae* (99.9% de similitude pour ARNr 16S et 30% de similitude pour l'hybridation ADN/ADN).

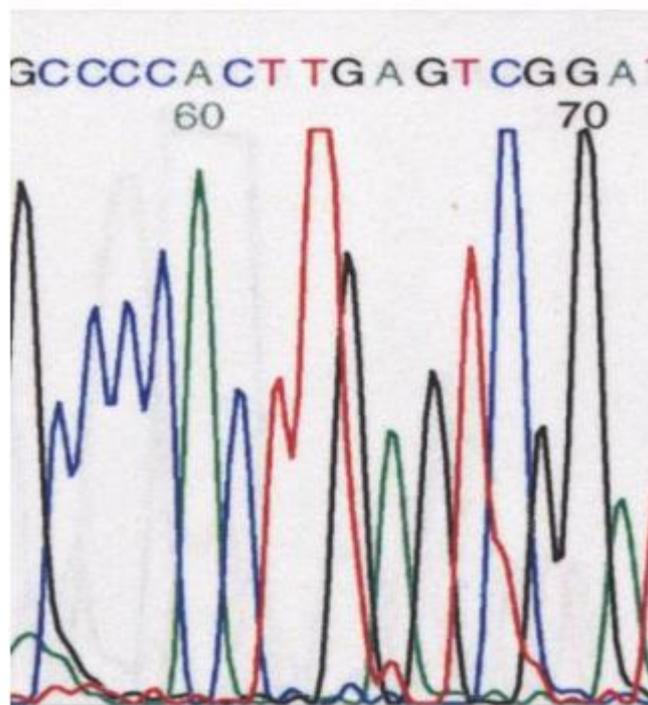


Figure n 4: Exemple de résultat du séquençage

-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. Un autre test est basé sur les séquences d'ADN hautement conservées et répétitives présentes chez la plupart des bactéries Gram négatives et chez quelques Gram positives. Il y a trois familles de séquences répétitives : les éléments BOX de 145pb, la séquence ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) de 124-127pb et REP (repetitive extragenic palindromic) de 35-40pb. Une autre technique alternative, le polymorphisme au niveau du nucléotide ou SNP, « single nucleotide polymorphism » permet d'échantillonner une fraction nettement plus grande du génome que ne le permettent l'analyse de l'ARNr 16S ou la MLSA. L'analyse SNP se concentre sur des changements mononucléotidiques, ou polymorphismes à ce niveau, dans des gènes spécifiques, des régions intergéniques ou dans d'autres régions non codantes. Ces régions attirent l'attention parce qu'elles sont normalement conservées et que par conséquent, le changement d'une paire de bases peut avoir une signification évolutive.

5. Types de classification

5.1. Classification artificielle

Elle est basée sur une clé qui regroupe un ensemble de bactéries partageant une même propriété phénétique.

5.2. Classification naturelle

On classe ici les microorganismes avec un maximum de critères sans les hiérarchiser. Il existe maintenant de nombreuses techniques d'étude de la composition chimique des bactéries et surtout de leurs structures moléculaires génétiques qui permettent d'établir entre elles des relations phénétiques et phylogénétiques fiables.

5.3. La classification de BERGEY's Manual

La classification de référence actuelle des bactéries est la classification de BERGEY's Manual. Sa première édition était en 1923 aux USA sous le nom de BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology. Son objectif initial était le regroupement exhaustif de l'ensemble des informations phénotypiques disponibles pour l'identification des espèces bactériennes reconnues, afin de permettre l'identification de souches bactériennes inconnues. Il y a eu neuf (9) éditions du BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology jusqu'au 1994. Avec l'apparition dans la 8ème édition (1984) d'une nouvelle classification des bactéries. Les bactéries sont classées en quatre divisions où une est réservée aux archaebactéries, alors que les trois autres sont définies sur la base de la présence ou non d'une paroi et sur sa nature: les bactéries à GRAM négatif, les bactéries à GRAM positif et les Mycoplasmes (bactéries sans paroi). C'est aussi en 1984 qu'est paru le premier volume de la première édition du BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology (constitué de quatre volumes) qui est la version exhaustive détaillée du BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology. Toutes les éditions proposent une classification phénotypique des bactéries, ces données étant alors disponibles. Ce n'est qu'en 2001 que le premier volume de la 2ème édition BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology est apparue. La classification proposée est pour la première fois phylogénétique, basée sur les données accumulées en ce domaine depuis les années 1970, grâce à la généralisation des études génomiques. C'est une classification naturelle totalement différente des précédentes classifications du BERGEY's Manual.

Les cinq volumes sont les suivants :

Volume 1- les archaea et les bacteria des branches les plus anciennes et les bacteria phototrophes.

Volume 2- les proteobacteria

Volume 3- les bacteria Gram positives pauvres en G+C

Volume 4- les bacteria Gram positives riches en G+C

Volume 5- les planctomycetes, les spirochaetes, les fibrobacteres, les bacteroidetes, les fusobacteria, les chlamydiae, les actinobacteria, les verrumicrobia et les dictyoglomi.

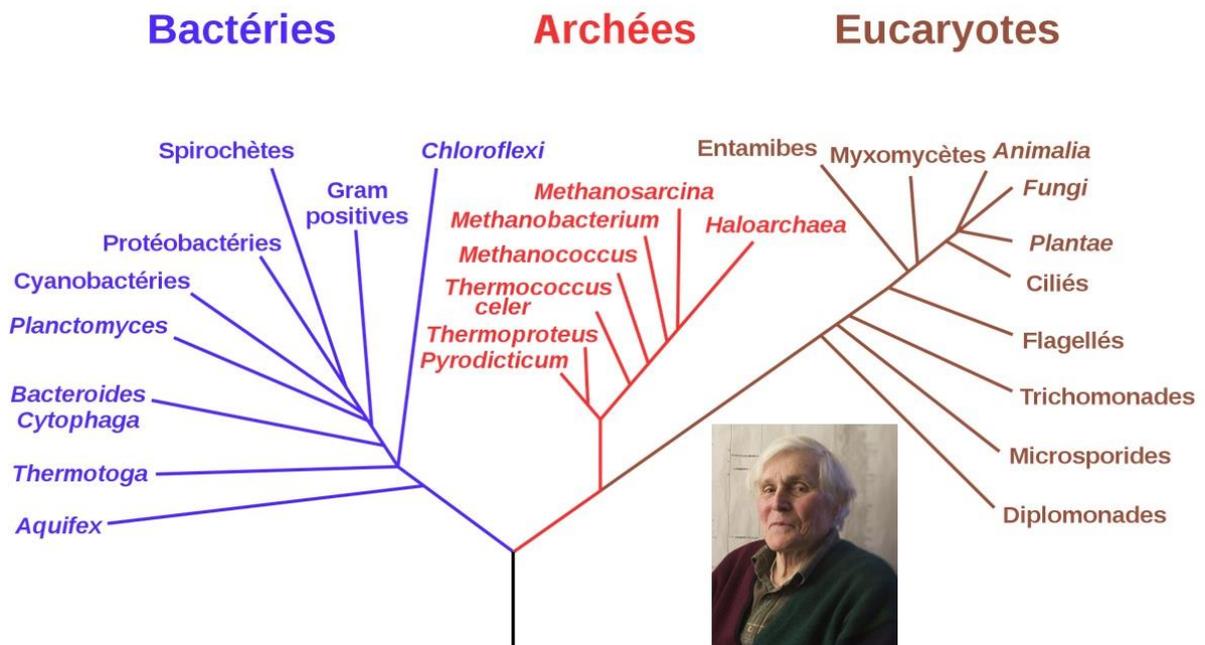


Figure n 5 : L'arbre phylogénique universel du vivant