

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA
TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire : Biologie moléculaire des procaryotes

Thème : Taxonomie des bactéries

Présenté par :

- REHAIL Amina
- NASSAR Imene

Devant le jury composé de :

- Président : M^{me} BEDIQUI Soureya M.A.A Université de Guelma.
- Examineur : M^{me} KHELLEF Messaouda M.A.A Université de Guelma.
- Encadreur : M^{me} TORCHE Esma M.A.A Université de Guelma.

Juin 2015

Résumé

La taxonomie ou taxinomie est l'étude de la diversité des micro-organismes, est généralement prise comme synonyme de la systématique ou de la bio systématique et des relations susceptibles d'exister entre eux. Elle recouvre trois domaines différents: la classification, la nomenclature et l'identification. La classification est définis comme l'arrangement des organismes en groupe ou taxon selon leur similitude ou leur parenté évolutive. L'identification consiste à placer un individu particulier dans un taxon connu ; et la nomenclature est l'ensemble des règles qui préside à l'attribution d'un nom à chaque taxon. 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 pour désigner des taxa à tous les niveaux.

Mots clés : Taxonomie, bactéries, systématique, identification

Produced with ScanTopdf

Summary

Taxonomy or taxonomy is the study of the diversity of the micro-organisms, is generally taken as synonym of systematic or the bio systematic and the relations likely to exist between them. It covers three different fields: classification, nomenclature and identification. Classification is defined like the arrangement of the organisms in group or taxon according to their similarity or their evolutionary relationship, the identification consists in placing a particular individual in a known taxon; and the nomenclature is the whole of the rules which governs the attribution of a name to each taxon. Modern bacterial taxonomy aims at the integration of all given and phenotypical, genotypic and phylogenetic information leading to a polyphasic taxonomy and a more stable classification to indicate taxon on all the levels.

Key words: Taxonomy, bacteria, systematic, identification

Produced with Scan PDF

الملخص

التقسيم هو دراسة تنوع الكائنات الدقيقة ، عموماً يؤخذ كمرادف للتصنيف أو التصنيف الحيوي والعلاقات المتواجدة بينها . التقسيم يشمل مجالات مختلفة :
التقسيم، التسمية و التعريف. التقسيم هو وضع الكائنات في أفواج أو أقسام على حسب التشابه و التقارب التطوري. التعريف هو وضع فرد معين ضمن قسم معروف. التسمية هي مجموعة القواعد التي تعمل على توزيع الاسم لكل مصنف.
التقسيم البكتيري الحديث يتطلب تدخل كل المعطيات و المعلومات المظهرية الوراثية و الفيلوجينية مما يؤدي الى تقسيم متعدد المراحل و اكثر استقرارا لتعريف الاصناف على جميع المستويات.

الكلمات المفتاحية : التقسيم، بكتيرية، تصنيف ، تعريف.

Sommaire

Introduction	1
Chapitre 1 : Généralités sur les bactéries	3
1-Bactérie	3
2- Structure	3
2-1- Enveloppe bactérienne	4
2-1-1- Paroi bactérienne	4
2-1-2- Capsule	4
2-1-3-Membrane cytoplasmique	4
2-2- Structures externes	5
2-2-1- Flagelles	5
2-2-2- Pili	5
2-3- Structures internes	5
2-3-1- Chromosome	5
2-3-2- Plasmides	5
2-3-3- Cytoplasme	5
3-Nutrition	5
4- Croissance	6
4-1-Méthodes d'études de la croissance	6
4-1-1- Mesure de la biomasse	6
4-1-2- Mesure de nombre de la cellule	7
4-1-3- Détermination de l'activité	7
5- Métabolisme	7
Chapitre 2 : Taxonomie bactérienne	8
1 – Définition de la taxonomie	8
1-1-Classification	8
1-2-Identification	8

1-3- Nomenclature	9
1-3-1- Principales règles de la nomenclature	9
2- Unité de base de la taxonomie	10
3- Les rangs taxonomiques	11
4- Niveaux de la taxonomie	11
4-1- Identification au niveau du genre	11
4-2- Identification au niveau de l'espèce	12
4-3- Identification au niveau de la famille et l'ordre	12
4-4- L'identification par clés dichotomiques	13
5- Importance de la taxonomie	13
6 - Taxonomie polyphasique	14
6-1- Taxonomie phénotypique	15
6-1-1- Définition et critères	15
6-1-2- Tests phénotypiques	16
6-1-2-1- Tests cytologique	17
6-1-2-2- Tests morphologiques	17
6-1-2-3- Tests biochimiques	17
6-1-2-4- Tests culturels	18
6-1-2-5- Tests nutritionnels	19
6-1-2-6- Résistance, tolérance et sensibilité	19
6-1-2-7- Tests sérologiques	20
6-1-3- Chimiotaxonomie	22
6-1-3-1- Composition de la paroi cellulaire	23
6-1-3-2- Polysaccharides	23
6-1-3-3- Peptidoglycanes	23
6-1-3-4- Composition lipidique	23
6-1-3-5- Composition cytochrome	25
6-1-3-6- Séquence d'acides aminés des protéines	25
6-1-3-7- Profils protéiques	25

6-1-4- Taxonomie numérique:	26
6-1-4-1-Principales données pour la taxonomie numérique	28
6-1-4-2- Dendrogramme	29
6-1-5-Limites de la classification phénotypique	30
6-2-Taxonomie moléculaire	31
6-2-1-Définition et critères	31
6-2-1-1-La composition en bases de l'ADN (mol G+C%)	32
6-2-1-2-Hybridation moléculaire	33
6-2-1-3-Etude des ARNr	35
6-3-Taxonomie phylogénique	36
6-3-1-Définition et critères	36
6-3-2-Arbre phylogénique	37
6-3-2-1-Les types d'arbres phylogénétiques	37
6-3-2-2- Méthodes générales des arbres phylogénétiques	38
6-3-2-3-L'arbre condensé et consensus	38
7- Méthodes utilisées pour l'identification moléculaire	39
7-1- Méthodes électrophorétiques de l'analyse de l'ADN	39
7-1-1-Profil plasmidique	39
7-1-2-Électrophorèse sur champ pulsé	40
7-1-3-Polymorphisme des longueurs de fragments de restriction (RFLP)	40
7-2- Méthodes basée sur la PCR	40
7-2-1-Typage	41
7-2-2 La technique PCR-RFLP	41
7-2-3-Technique RAPD ou AP-PCR	42
7-2-4-Technique REP-PCR	43
7-2-5- Technique AFLP	43
7-2-6- Technique PFGE	43
7-3-Utilisation de méthodes moléculaires pour la microscopie:	44
8-Identification des bactéries dans le domaine de la bactériologie clinique	44

8-1- Le diagnostic d'orientation	45
8-2- Le diagnostic d'espèce	45
8-3-Détermination de marqueurs épidémiologiques ou utiles au traitement	46
8-4-Méthodes rapides d'identification	46
Conclusion	47
Références bibliographique	49

Produced with ScanTOPDF

Introduction

Produced With ScantOPDF

Introduction

Le terme bactérie est largement utilisé dans le sens général d'organisme procaryotes. Les bactéries sont des organismes minuscules, unicellulaires, autonomes que l'on trouve partout avec un génome habituellement circulaire formé d'une double hélice d'ADN.

Le monde vivant est très diversifié, qu'il soit visible ou microscopique, c'est pour quoi une classification est nécessaire afin d'exploiter et de comprendre le monde vivant.

La taxonomie ou taxinomie est l'étude de la diversité des micro-organismes et des relations susceptibles d'exister entre eux. Elle est généralement prise comme synonyme du systématique ou du bio systématique et est traditionnellement divisée en trois parts: la classification, l'identification et la nomenclature (Geraldine et Delphine, 2003 ; Torche, 2006).

L'identification d'un micro-organisme est fondée sur des critères subjectifs. Quelle que soit la qualité du travail réalisé et de la méthode d'identification utilisée, l'identification repose aussi sur la présomption (a priori) du genre.

Toute la démarche technique peut être correcte mais aboutir à un résultat erroné. C'est le regard critique du biologiste qui peut détecter cette erreur. Il se base sur la présomption diagnostique a priori de l'espèce grâce à la connaissance de l'environnement au sens large et des limites de la méthode d'identification. Une mauvaise hypothèse de départ peut conduire à un faux diagnostic sans qu'aucune erreur ne puisse être détectée dans le processus d'identification (Géraldine, 2003).

L'identification des bactéries repose sur l'étude de leur croissance en présence de divers substrats ou étude du métabolisme bactérien, on peut ainsi étudier le métabolisme protéique ou le métabolisme glucidique des bactéries par exemple. La combinaison des différents résultats obtenus permet de définir le profil métabolique de la bactérie analysée ce qui permet de l'identifier.

Les progrès réalisés dans la connaissance de l'ADN bactérien permettent des comparaisons beaucoup plus fines entre les bactéries et une classification plus rigoureuse

Cette recherche repose sur la connaissance de la taxonomie bactérienne et il est structuré en deux chapitres :

- Le premier concerne des généralités sur les bactéries,
- Le second c'est des notions sur la taxonomie et l'identification bactérienne.

Produced with ScanTOPDF

Chapitre 1 :

Généralités sur les bactéries

Produced with Scantopdf

Chapitre 1 : Généralités sur les bactéries

1-Bactérie

Les bactéries sont des organismes minuscules que l'on trouve partout. Elles manifestent parfois leur présence-les blessures s'infectent, le lait s'acidifie, la viande se putréfie – mais habituellement nous les ignorons parce que leurs activités sont moins évidentes et à cause de leur existence. Dans la plupart des cas, la bactérie est un être unicellulaire autonome de taille variant de 0,5 à 1,5 μm . La cellule bactérienne présente une organisation procaryote et diffère de façon marquée des cellules eucaryotes des animaux et des plantes. On place les bactéries dans la catégorie des micro-organismes, ceux-ci comprennent outre les bactéries, plusieurs types d'autres organismes, les algues, les champignons ; les lichens les protozoaires, les virus et les agents sub viraux (Singleton, 2002).

Les bactéries vivent en colonies, où toutes les cellules sont identiques. Chaque cellule doit tirer de son environnement les éléments nutritifs nécessaires et synthétiser les molécules pour s'allonger ou diviser. Toutes ces opérations sont contrôlées par leur génome et impliquent plusieurs gènes (Berche, 2003).

2- Structure

Le principal composant de la bactérie est l'eau, elle représente environ 80% du poids de la bactérie. L'analyse sur un poids sec donne les résultats suivants : Carbone 50% , Azote 15%, Hydrogène 10%, Oxygène 20%, Phosphore 3%. Soufre, Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , Na^{++} (Gérard, 2011).

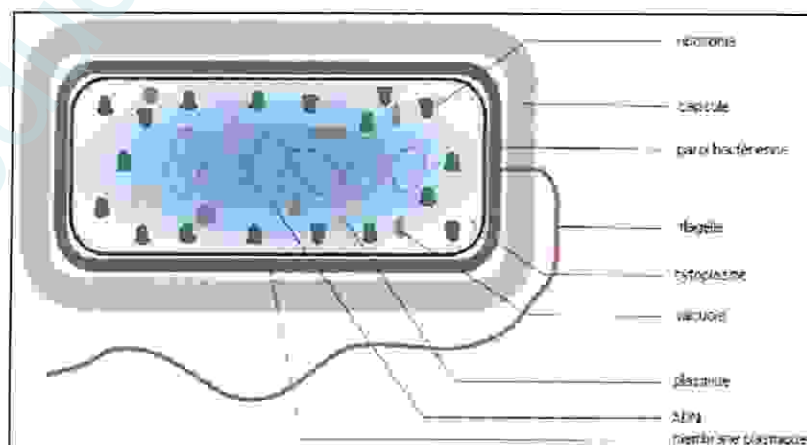


Figure 01 : schéma présente la structure bactérienne (Gérard, 2011).

2-1- Enveloppe bactérienne

2-1-1- Paroi bactérienne

C'est une barrière rigide présente chez presque toutes les bactéries. Elle joue un rôle de protection mécanique vis-à-vis de l'extérieur. C'est elle qui donne la forme à la bactérie. C'est aussi sa composition qui est à l'origine des différentes réactions à la coloration de GRAM (beaucoup moins développées chez GRAM+)

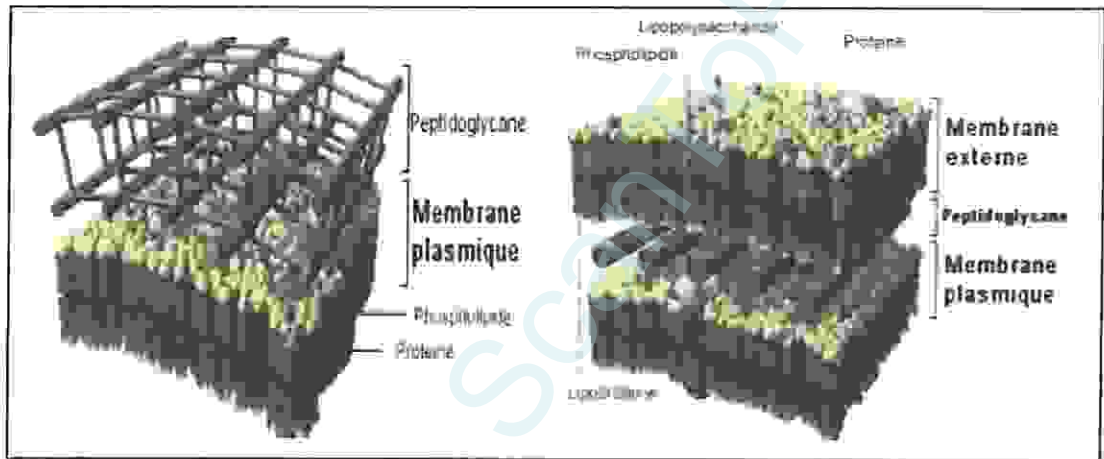


Figure 02: la paroi bactérienne à Gram+ / Gram- (Gérard, 2011).

2-1-2- Capsule

C'est une structure dense, qui n'est présente que chez certaines bactéries (élément inconstant) contribue à leur pathogénicité en rendant plus difficile leur destruction par le système immunitaire. La capsule joue un rôle important, la capsule empêche les bactéries d'être phagocytées dans l'organisme.

2-1-3-Membrane cytoplasmique

De structure proche de celles des eucaryotes, elle sert de barrière chimique entre l'environnement extérieur et le cytoplasme de la bactérie. Elle est donc le siège d'échange avec cet environnement ex. : entrée du glucose, sortie des déchets ou des productions bactériennes (Gérard, 2011).

2-2- Structures externes

2-2-1- Flagelles

Ce sont des filaments, qui facilitent le mouvement des bactéries (selon le même mécanisme que le flagelle des spermatozoïdes).

2-2-2- Pilis

Ce sont aussi des filaments, beaucoup plus courts que les flagelles. Ils permettent aux bactéries de mieux adhérer à certaines surfaces ou tissus cellulaires.

2-3- Structures internes

2-3-1- Chromosome

Le chromosome est unique et n'est pas situé dans un noyau délimité par une membrane. constitué d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) ; Il est porteur de tous les gènes nécessaires à la bactérie pour sa survie et son développement (Gérard, 2011).

2-3-2- Plasmides

Ce sont des morceaux d'ADN, beaucoup plus petits, le chromosome (au moins 100 fois) porteurs d'un ou plusieurs gènes codant pour des protéines supplémentaires ; non indispensables à la survie de la bactérie, mais apportant de nouvelles capacités (résistance aux antibiotiques, production toxine), certaines bactéries sont capables de s'échanger les plasmides (Gérard, 2011).

2-3-3- Cytoplasme

Milieu intérieur de la bactérie. Il contient donc le chromosome, les éventuels plasmides, et tout le nécessaire à son bon fonctionnement.

3-Nutrition

La source d'énergie des bactéries peut être de nature lumineuse (bactéries phototrophes) ou représentée par des composés minéraux ou organiques divers : on parle alors de bactéries chimiotrophes . Parmi cette dernière catégorie de bactéries, on distingue les bactéries chimiolithotrophes tirant leur d'énergie d'un élément minéral et les bactéries chimioorganotrophes pour lesquelles la source d'énergie est un élément organique. La plupart

des bactéries d'intérêt médical sont des bactéries chimio organotrophes. La source de carbone nécessaire à la vie bactérienne peut être le dioxyde de carbone qui est la source de carbone exclusive pour les bactéries autotrophes alors que les bactéries dites hétérotrophes comme un alcool, l'acide acétique, des sucres divers, ...

Les bactéries doivent également trouver dans leur environnement une source d'azote et une source de soufre. Les bactéries ont des besoins inorganiques (exemple du phosphore), Les autres éléments nécessaires à la vie bactérienne sont les ions comme le sodium, le potassium, le magnésium, le chlore ; divers oligo-éléments comme le manganèse, le nickel, le zinc, ... ; divers facteurs de croissance comme des acide aminés (acide folique, acide nicotinique, ...) ou des dérivés de l'hème et des vitamines (Marchandine, 2007).

C'est les besoins élémentaires et énergétiques nécessaires à la croissance de la bactérie, ainsi que des facteurs physico-chimiques susceptibles d'influencer cette croissance. La cellule bactérienne, grâce à son système enzymatique très développé, va donner naissance en peu de temps (20 mn en moyenne pour la majorité des bactéries de l'environnement), à 2 bactéries filles : on parle de croissance bactérienne.

Une bactérie se forme, se développe, vit et se reproduit puis dépérit et meurt : (Nutrition , Métabolisme, Croissance bactérienne,) (Tiouit, 2011).

4- Croissance

La croissance bactérienne consiste une augmentation des parties constituantes. Le génome est constitué d'ADN chromosomique et extra-chromosomique (plasmidique) (Drouet, 2010). Les conditions de la croissance : L' énergie ; lumineuse espèces photosynthétiques et chimique espèces chimiotrophe , l'eau et les Condition physicochimique comme la température PH et oxygène (3).

4-1-Méthodes d'études de la croissance

4-1-1- Mesure de la biomasse

Dans une population bactérienne en croissance, la biomasse (ou quantité de matière vivante) augmente régulièrement. On peut l'évaluer de différentes façons.

4-1-2- Mesure de nombre de la cellule

Le nombre de cellule d'un milieu peut-être évalué par des méthodes directes c-à-d. compté directement le nombre de cellules .

4-1- 3- Détermination de l'activité

Il est possible de suivre par des techniques biochimiques la consommation d'un substrat ou l'apparition d'un produit ex : dosage de l'éthanol .

5- Métabolisme

Ensemble des transformations chimiques qui assurent l'élaboration des constituants cellulaires et leur fonctionnement. Toutes les réactions chimiques ayant lieu dans les bactéries sont catalysées par des enzymes spécifiques. Elles intéressent à la fois les glucides, les lipides, et les protides. L'exploration ou l'étude de certaines étapes de ce métabolisme donnent les caractères biochimique d'une bactérie (identification de l'espèce bactérienne) (Tiouit, 2011).

Chapitre 2 : Taxonomie bactérienne

Produced with Scantopdf

Chapitre 2 : Taxonomie bactérienne

1 – Définition de la taxonomie

La taxonomie ou taxinomie est l'étude de la diversité des micro-organismes et des relations susceptibles d'exister entre eux. Elle est généralement prise comme synonyme du systématique ou du biosystématique et traditionnellement divisée en trois parts: la classification, l'identification et la nomenclature (Geraldine et Delphine, 2003 ; Torche, 2006).

1-1-Classification

La classification est l'arrangement des organismes en groupe ou taxon selon leur similitude ou leur parenté évolutive. Elle a pour but l'attribution d'une identité à un objet vivant. Cette attribution permet de résumer l'ensemble des propriétés assignées à un groupe d'individus de façon à prédire les propriétés d'un nouveau membre du groupe sans être obligé de l'explorer totalement. En résumé, l'assignation d'une bactérie à un taxon permet d'en déduire les caractéristiques écologiques, épidémiologiques voire thérapeutiques que possède ce taxon (Geraldine et Delphine, 2003 ; Torche, 2006).

La classification bactérienne n'est pas forcément bien adaptée à la pathologie. En bactériologie médicale on peut classer les bactéries selon une classification clinique les bactéries sont la cause de grands syndromes ou selon une classification pathogénique (1).

1-2-Identification

L'identification des organismes inconnus est le processus pour déterminer si un organisme appartient à une des unités définies (classifiées) et marquées (nommées) (Torche, 2006). L'identification consiste à placer un individu particulier dans un taxon connu. La souche inconnue est comparée à des espèces déjà décrites (souche types) et le nom de l'espèce la plus similaire est proposé (Geraldine et Delphine, 2003). La définition actuelle de l'identification ne comprend plus la comparaison de propriétés biochimiques mais prend en compte l'identification globale de L'ADN avec une homologie supérieure à 70% (Geraldine et Delphine, 2003).

1-3- Nomenclature

La nomenclature est l'ensemble des règles qui préside à l'attribution d'un nom à chaque taxon, c'est -à-dire marqué les unités définies dans la classification. Elle a pour but d'unifier le langage scientifique (Geraldine et Delphine, 2003). Cependant, il y a une interaction dynamique continue entre la classification, la nomenclature et l'identification des nouveaux taxa (Torche, 2006).

La nomenclature bactérienne utilise des mots latins ou latinisés qui sont traditionnellement écrits en italique ou ils sont soulignés dans un manuscrit (Singleton, 2004).

1-3-1- Principales règles de la nomenclature

Les bactéries peuvent se différencier, par exemple, par leur forme, leur taille ou leur structure, par leurs activités chimiques, par les éléments nutritifs qui leur sont nécessaires, par la forme de l'énergie qu'elles utilisent, par les conditions physiques dans lesquelles peuvent croître par leurs réactions à certains colorants. De tels caractères facilement vérifiables sont largement utilisés, pour classer (et identifier) les bactéries. Comme les autres règnes biologiques, les bactéries sont réparties en catégories hiérarchisées (familles, genres, espèces...) (Singleton, 2004).

Le système binomial du botaniste suédois Carl von Linné est utilisé. La première partie du nom est le nom de genre, la seconde partie est l'épithète ou le nom de l'espèce (Singleton, 2004).

Les noms sont issus du grec ou du latin ou des deux. On joint un préfixe ou un suffixe (ex :-oidés). Ce préfixe ou ce suffixe modifie le sens du mot (dérivation) ou lui donnent une signification nouvelle (ex : *Y.Paratuberculosis*) cause une affection pulmonaire semblable à la tuberculose.

Les noms de famille et de genre s'écrivent avec une majuscule.

Les espèces qui sont suffisamment semblables sont placées dans un même genre, et les genres qui montrent une certaine similarité sont groupés dans la même famille. Une espèce peut être subdivisée en deux souche ou plus (Singleton, 2004).

2- Unité de base de la taxonomie

L'unité taxonomique la mieux définie est l'espèce. Elle se compose d'un groupe de souches d'origine commune, y compris la souche type, et est principalement définie en terme de similitude entre les souches. Malgré que l'espèce soit l'élément central dans la taxonomie bactérienne, la structure hiérarchique de la taxonomie exige également les taxa les plus hauts du genre et de la famille (Torche, 2006).

En toute rigueur, les souches appartenant à une même espèce, dérivent d'un ancêtre commun et possèdent des structures génétiques très voisines. Les génomes des souches d'une même espèce ont plus de 70 % d'homologies et présentent moins de 5 % de divergences à l'intérieure des séquences homologues de leur génomes (Fauchere, 1997).

Les structures génétiques n'étant pas facilement accessibles à l'analyse, on regroupe en général les souches dans des phénospécies sur la base de leurs caractères phénotypiques et de leur adaptation écologique. Les espèces sont regroupées en genre, familles, ordres et classes et peuvent être subdivisées en sous-espèces. Sur la base de marqueurs métaboliques, antigéniques ou de virulence. Pour des raisons pratiques, on peut également regrouper les souches d'une espèce en fonction d'une propriété importante en bactériologie médicale. Par exemple, les résistotypes regroupent les souches en fonction de leurs profils de résistance aux antibiotiques (Fauchere, 1997).

Une souche est une population d'organismes descendant d'un organisme unique ou d'un isolat de culture pure. Au sein d'une même espèce les souches peuvent présenter des différences légères entre elles qui pourront être caractérisées sur la base : de leurs propriétés biochimiques ou physiologiques pour les biovars ; de leurs propriétés antigéniques pour les sérovars; de leur facteur de virulence pour les pathovars (Geraldine et Delphine, 2003).

Une souche type, en bactériologie, est une souche servant à décrire une espèce bactérienne. L'identification des bactéries passe par une souche d'une espèce qui est désignée comme la souche type, elle est habituellement l'une des premières souches étudiées et est souvent mieux caractérisée que d'autres souches. Cependant, cette souche d'une espèce bactérienne n'a pas besoin d'être le membre le plus représentatif et seules les souches très similaires à la souche type sont incluses dans une même espèce (1).

3- Les rangs taxonomiques

En préparant une classification c'est-à-dire 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

La classification traditionnelle repose sur une hiérarchie fixe de catégories définie de la façon suivante :

Règne → Embranchement → classe → Ordre → Famille → Genre → espèce (Tifrit, 2010).

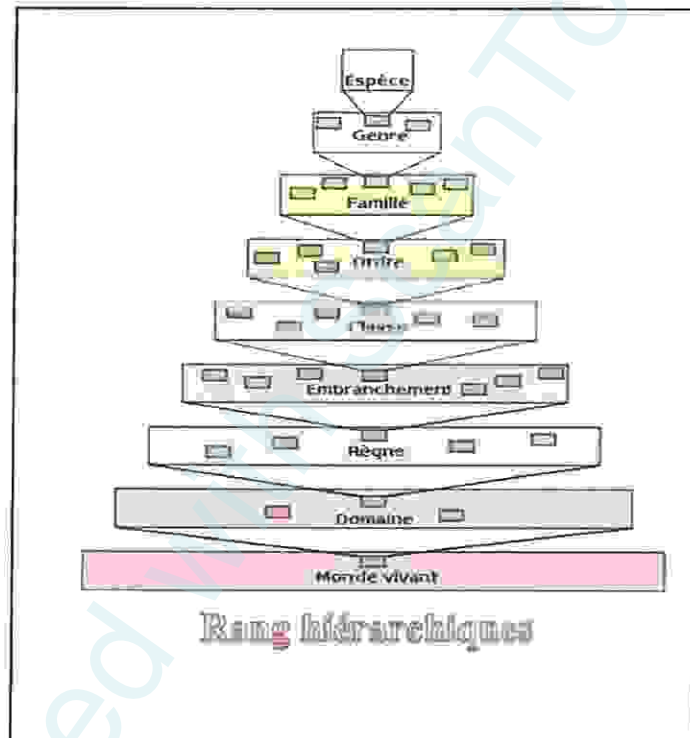


Figure 03 : les rangs hiérarchiques (Tifrit, 2010)

4-Niveaux de la taxonomie

4-1-Identification au niveau du genre

Groupe bien défini, d'une ou plusieurs espèces, qui est clairement séparé des autres genres. L'identification au niveau du genre est parfois suffisante.

Lors de l'identification au niveau du genre, ne pas introduire un nom déjà utilisé pour un métazoaire, une bactérie ou un champignon. Il est imprimé en italique (ou souligné dans les

textes manuscrits) et sa première lettre est majuscule. Après sa première citation le nom de genre est abrégé à sa première lettre sauf si ambiguïté. Le nom de genre est en principe féminin (Geraldine et Delphine, 2003).

4-2-Identification au niveau de l'espèce

La plupart du temps, l'identification au niveau de l'espèce est nécessaire. Les noms d'espèces sont imprimés en italique. Dans un texte manuscrit, ils doivent être soulignés. L'espèce (l'épithète spécifique) commence par une minuscule.

Des locutions latines sont parfois utilisées à la suite du genre, pour préciser qu'on a identifié une souche jusqu'au niveau du genre seulement et qu'elle peut appartenir à n'importe quelle espèce de ce genre (*Staphylococcus* sp = species) ou pour désigner l'ensemble des espèces d'un genre (*staphylococcus* spp = species pluriel). D'autres locutions désignent par exemple une espèce nouvellement créée (sp nov = species nova) ou des noms nouveaux (nom nov = nomen novum) et s'écrivent à la suite du nom d'espèce (Fauchere, 1997).

Entre la découverte d'une nouvelle espèce et son étude taxonomique complète il s'écoule parfois plusieurs années. Pendant ce temps, l'espèce est désignée par un nom ou un code provisoire ; par exemple, *Helicobacter pylori*, lors de sa découverte et avant même qu'on sache le cultiver, été nommé (Campylobacter like organism ou CLO) (Fauchere, 1997). Des noms synonymes rappelant certains caractères ou le pouvoir pathogène sont parfois encore employés comme Staphylocoque doré pour *Staphylococcus aureus* ; ou encore, des noms rappelant le découvreur ; le cas de Bacille de Friedlander pour *Klebsiella pneumoniae*. (Fauchere, 1997).

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.

4-3-Identification au niveau de la famille et l'ordre

Les noms des familles et des ordres bactériens ne s'écrivent pas en italique, mais reçoivent une majuscule initiale. En outre, ces noms se terminent de façon standardisée. Les noms de famille finissent en (-aceae) par exemple, (les Entérobactériaceae) et les noms d'ordre en (-ales) par exemple, (les Actinomycétales). En générale les membres d'une famille

bactérienne auront une structure similaire utiliseront la même forme d'énergie et réagiront d'une même façon typique à certains colorants. Dans une telle famille, les espèces seront groupées en genres sur base de leurs activités chimiques, de leurs exigences nutritives, des conditions dans lesquelles elles peuvent croître et selon leur forme et leur taille (Singleton, 2002).

4-4-L'identification par clés dichotomiques

Cette identification est conduite par étape successive ; une réponse positive à un test A oriente vers un test B. Les réponses à ces nouveaux tests déterminent des nouveaux chemins vers d'autres tests et par branchements successifs ; on arrive au diagnostic (Cuq, 2007).

Les tables diagnostiques sont des catalogues contenant les réponses d'un lot de souches d'un même taxon à un grand nombre de tests utiles. Dans le Bergey's Manuel, les résultats sont ainsi codés :

Si 90 % des souches possèdent le caractère, on code + pour la souche type

Si 90 % des souches ne le possèdent pas, on code -

Entre 11 et 89 % on code *d*

Si le caractère est instable on code *v*

La souche à identifier est soumise à un maximum des tests du catalogue et les résultats obtenus sont comparés aux résultats de la table diagnostique (Cuq, 2007).

5-Importance de la taxonomie

La taxonomie des microorganismes permet de mettre de l'ordre dans l'énorme quantité de connaissances que nous avons des organismes, parce que tous les membres d'un groupe donné partagent de nombreuses caractéristiques. Elle permet de faire des prédictions et des hypothèses pour une recherche future, basés sur la connaissance d'organisme similaires, et répartit les micro-organismes en groupes significatifs utiles, avec des noms précis de sorte que les microbiologistes peuvent les étudier et communiquer efficacement, essentiellement pour l'identification précise des micro-organismes (2).

La taxonomie organise une « banque de données » sur les microorganismes pour distinguer les uns des autres (spécialement les différentes souches d'une même espèce), afin d'aider ultérieurement à identifier des souches inconnues, en les comparant à des souches connues caractérisées. Pour cela est il indispensable pour identifier un nouvel isolement donner un accès à la phylogénie (c à d les liens de parenté entre les différents organismes) pour examiner les relations phylogénétiques au sein d'un groupe donné d'organismes (Singleton, 2004).

6 - Taxonomie polyphasique

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.

Cette dernière est réalisée en choisissant de diverses techniques complémentaires avec différents niveaux distinctifs. Le niveau de discrimination d'une technique peut changer selon le taxon bactérien étudié, et il est d'intérêt primaire de comprendre à quel niveau cette méthode diffuse l'information taxonomique. Cependant, chaque technique utilisée dans la taxonomie a sa propre puissance distinctive sur les différents taxa, et leur champ d'application dépend des conditions et du nombre de souches à caractériser (Torche, 2006)

La taxonomie de type polyphasique a été proposé et utilisé pour désigner des taxa à tous les niveaux (Benguedouar, 2000).

Le niveau de l'information taxonomique de certaines techniques est illustré dans la figure suivant :

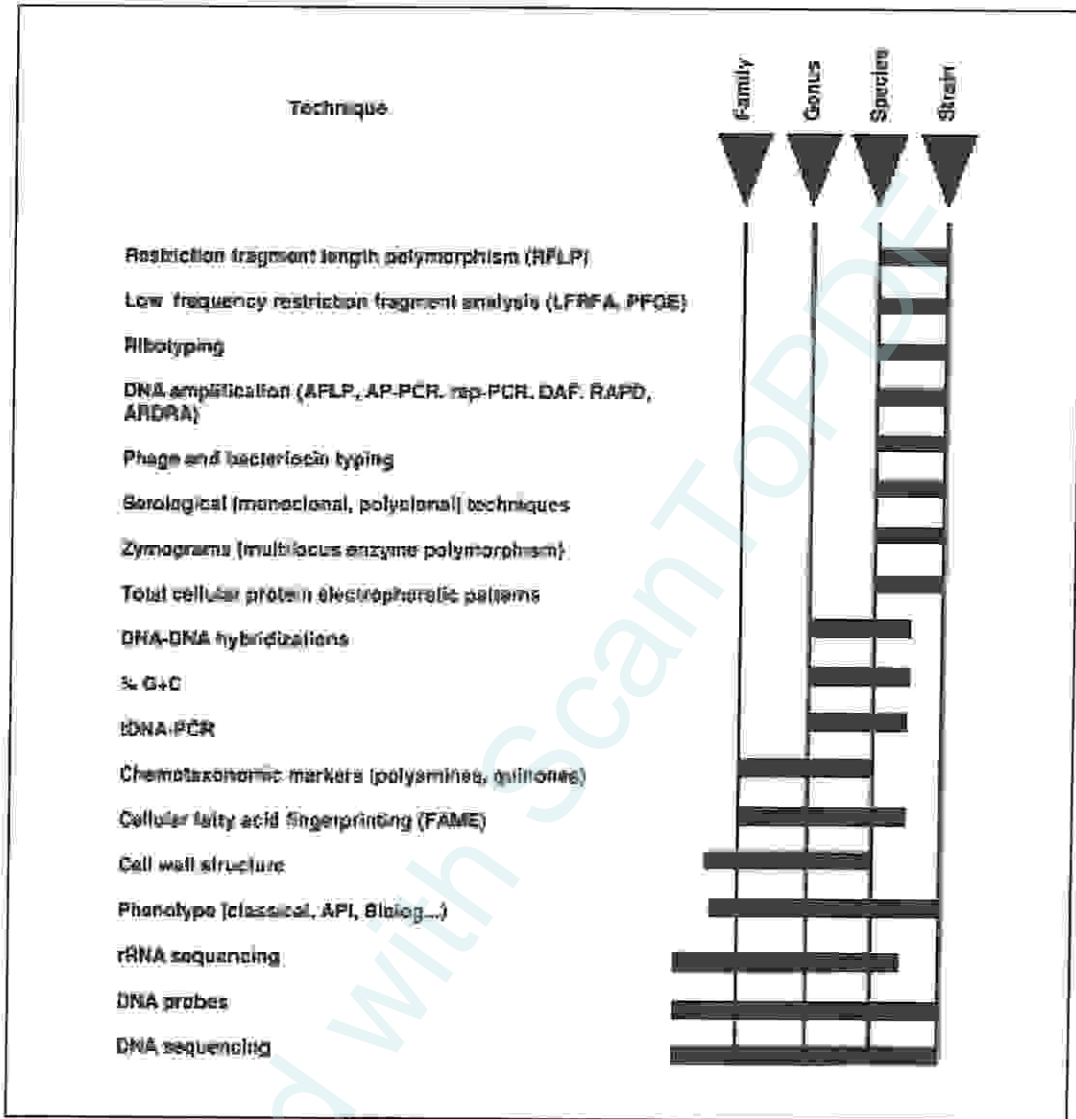


Figure 04 : Niveau de l'information taxonomique de certaines des techniques utilisées (Vandamme et coll., 1996).

6-1- Taxonomie phénotypique

6-1-1- Définition et critères

La classification phénotypique est basée sur l'ensemble des similitudes et de différences entre les bactéries. La consistance phénotypique est exigée pour produire des systèmes taxonomiques utiles et peut donc influencer la profondeur d'une ligne hiérarchique. Les méthodes phénotypiques constituent la base pour la description formelle des taxa (Fauchere, 1997).

La caractérisation phénotypique comporte les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. La morphologie d'une bactérie inclut les caractéristiques cellulaires (forme, endospores, flagelles, corps d'inclusion, coloration des Gram ...) et coloniales (couleur, dimension, forme ...). Les caractéristiques physiologique et biochimiques incluent des données sur la croissance aux différentes températures et valeurs de pH, aux différentes concentrations de sels, aux conditions atmosphériques, à la croissance en présence de différents agents antimicrobiens et aux données sur la présence ou l'activité de divers enzymes et composés de métabolisme (Torche, 2006).

Les marqueurs phénotypiques sont les plus accessibles et les plus utilisés pour identifier les souches. L'existence d'un marqueur phénotypique dépend de la présence d'un ou plusieurs gènes et de leur expression dans les conditions expérimentales réalisées. Le groupe taxonomique étant défini par des identités génomiques, il pourra exister une différence entre les marqueurs phénotypiques détectés et le génotype de la souche. Il s'agit d'une cause d'erreur qui est compensée par le grand nombre de marqueurs qui sont habituellement déterminés pour identifier une souche. Par ailleurs, les méthodes modernes de traitement des données phénotypiques prennent en compte ces discordances (Fauchere, 1997).

6-1-2- Tests phénotypiques

L'identification des bactéries en générale basé sur des tests biochimiques qui mettent en évidence les caractéristiques métaboliques des organismes. C'est une analyse indirecte du génome par exemple : quels sucres sont utilisés par une espèce de bactéries donnée (Favet, 2013).

En analyse médicale, l'identification est plus simple dans la mesure où les candidats sont moins nombreux et mieux connus. De nombreux milieux spécifiques et tests ont été développés pour eux (Favet, 2013).

Heureusement, l'origine de l'organisme fournit souvent des indications qui, ajoutée à quelque observation et tests simples, peuvent conduire à l'identité possible de l'organisme au moins, permettent de limiter la recherche à l'un des principaux groupes bactériens (Singleton, 2004).

Il est clair que la pratique de l'identification est facilitée si le bactériologiste connaît les types d'organismes qui peuvent se trouver dans un environnement donné est au fait des

principales caractéristique qui distinguent ; les familles, genres et espèces communs de bactéries (Singleton, 2004).

6-1-2-1-Tests cytologique

Les tests cytologiques comportent :

- **La micromorphologie cellulaire** : forme, dimension et organisation cellulaire, présence et disposition des flagelles, présence de spore, de la capsule, des granules de poly-3hydroxybutyrate, coloration de Gram.
- **La mobilité** : elle s'apprécie à l'état frais ou en évaluant la diffusion de la culture dans un milieu faiblement gélosé, ce caractère est lié à la présence de flagelles dont le nombre et le mode d'insertion sur la cellule bactérienne sont des caractères importants qui peuvent être mis en évidence par des colorations spéciales (coloration de Rhodes). L'expression phénotypique de la mobilité est extrêmement variable et dépend souvent des conditions de culture (Fauchere, 1997).
- **La formation d'endospores** : relativement peu de bactérie peuvent former. Si l'une de ces bactérie est cultivée pendant plusieurs jours ou une semaine sur un milieu solide, on peut habituellement détecter les endospores en appliquant à un frottis fixé par la chaleur. La coloration de la spore, la forme de l'endospore et sa position dans la cellule sont des caractéristiques qu'on utilise parfois dans la classification. La meilleure façon de les observer est le microscope à contraste de phase. On peut distinguer les spores des autres inclusions intracellulaire par coloration différentielle, par exemple, le Noir Soudan B colore les granules de PHB, mais pas les endospores (Singleton, 2004).

6-1-2-2-Tests morphologiques

- **Morphologie de la colonie** : diamètre, forme, élévation, aspect de la surface, apparence, opacité, texture, marge...
- **Production de pigments** (Torche, 2006).

6-1-2-3-Tests biochimiques

- Production d'acide acétique de l'éthanol.

- Production d'acides de carbohydrates : amygdaline, arbutine, arabitol, arabinose, cellobiose, dextrine, dulcitol, érythritol, éthanol, fructose, galactose, glucose, glucogène, inositol, inuline, lactose, maltose, mannitol, melibiose, muconate, N-acetylglucosamine, raffinose, rhamnose, ribose, salycine, sorbitol, saccharose, trehalose, xylose
- Activité esculinasique.
- Aminoacide décarboxylase : lysine, ornithine, histidine, acide glutamique, glutamine, asparagine, malate.
- Arginine dehydrolase .
- Hydrolyse de la caséine.
- Réaction au jaune d'œuf.
- Activité estérasique et lipasique.
- Hydrolyse de la gélatine.
- Oxydation du gluconate.
- Activité hémolytique.
- Production d'indol.
- Production de levain.
- Test du rouge de méthyle.
- Réduction des nitrates : production de nitrites, dénitrification.
- Activité oxydasique.
- Activité pectinasique.
- Hydrolyse de l'urée.
- Réaction de voges-prokæur.
- Réaction protéolytique sur lait tournesolé.
- Test du 3cétolactose.
- Précipitation du calcium-glucérophosphate.
- Production de mélanine (O'Brien et Colwell, 1987).

6-1-2-4-Tests cultureux

- Croissance sur milieux sélectifs : gélose Mac Conkey (MCA), gélose thiosulfate-citrate-bile », sels-saccharose (TCBS), gélose Samonella-Shigella (SS), gélose à l'éosine et bleu de méthylène (EMB), gélose au vert brillant (BG), gélose au sélénite de Na, bouillon présomptif des entérocoques, bouillon à l'éthyl violet et azide

(EVA).Gélose Brucella, gélose cœur-cystéine, eau peptonée, gélose tryptone-extrait de levure (TY), gélose luria-bertoni (LB) ;vitesse de croissance (temps de génération). (O'Brien et Colwell, 1987).

6-1-2-5-Tests nutritionnels

- **Utilisation comme seule source de carbone** : acide adipique, acide glucuronique, acide glutamique, acide vanillique, aconitate, amidon, amygdaline, alcool amylique, ammonium oxalate, ammonium tartrate , anthrone, L-arabinose, arbutine, asparagine, 1,2-butylène glucol, malonate de calcium , caprate, hydrolysai de caséine, chlorate de choline, cellobiose, cystéine, cholestérol, dextrine ,duicitol,ergostérine, erythrose, esouline, hexose-6-phosphate, D-fructose, fucos. D-galactose, glycérol, glucose, inositol, inuline, cis-aconitate,(x-cétoglutarate, lactose, lysose, citrate de magnesium, malate, maltose,D-mannose, D(+)-melibiose, D-melisitose monohydrate, méthanol, O-methyl-D-mannoside, méso-inositol, methyl-DL-glucoside, mésoérythritol, 7-méthionine. nicotinate , pyruvate, polyéthylèneglycol, 1,2-propylèneglycol, riboflavine, raffinose, rhamnose, D-ribose, salycine, acétate de NA ,alginate de NA, benzoate de NA, citrate de NA, butyrat de NA, D-gluconate de NA, formiate de NA, hippyrate de NA, succinate de NA, sorbitol, tagatose, tréhalose, hydroxyméthylaminomethane, urée,vanniline, xylène, xylose.
- **Utilisation comme seule source d'azote** : acide aspartique, acide glutamique, alanine, asparagine ; arginine, cystéine, cystine,DI-phénylalanine, glucyl-DL-valine, glutamine, glycine, isocytosine , isoleucine, histidine, leucine, lysine, L-méthionine, pyrimidine, proline, glutamate de Na, serine, tyrosine, tryptophane, valine.
- **Besoin en vitamines** : acide ascorbique, acide folique, acide thiotique, nicotinique, acide panthoténique, biotine, calcium-panthoténate cyanocobalamine, pyridoxine, nicotinamide, riboflavine, thiamine (O'Brien et Colwell, 1987).

6-1-2-6-Résistance, tolérance et sensibilité

- **Résistance aux antibiotiques** : acide nalidixique, ampicyhne, auréomycine, chloramphénicol, dihydrostreptomycine, éthambutal, furazolidone, gentamycine kanamycine, lincomycine néomycine, nitrofurantoiné, novobiocine, oiendomycine

penicilline G; polymyxine, rifampicine, spectinomycine, streptomycine, terramycine, tétracycline, triméthoprime, vancomycine,

- **Résistance aux métaux lourds** : aluminium, cadmium, mercure, plomb, cuivre, zinc.
- **Tolérance aux colorants** : bleu de bromothymol, bleu de méthylène, pourpre de bromocrésol, bleu de crésyl brillant, cristal violet, erythrosine A, fuchsine basique, méthyl-violet, nigrosine, orcéine, picocarminiopyromine B, G et Y, rosanilline, rouge iodé, rouge de méthyle, rouge neutre, safranine T, safranin O, vert brillant, vert lumière SF, vert de méthyle, violet de gentiane.
- **Tolérance aux pesticides** : carbendazole, chlordimeform, diméthoate, malathion, ométhoate, phoxine.
- **Autres tolérances** : tellurite de K, nitrate d'argent, desoxycholate de Na, hypochlorite de Na (O'Brien et Colwell, 1987)

6-1-2-7- Tests sérologiques

Les techniques sérologiques ou immunologiques se basent sur la capacité des constituants de la cellule bactérienne à agir comme antigènes, donc de réagir avec les anticorps des Vertébrés. Les plus utilisées sont l'agglutination, la précipitation, la fixation du complément, l'immunofluorescence.

Dans la taxonomie bactérienne, elles se distinguent en deux catégories :

Analyses immunologiques détectant les différences ou similarités entre bactéries en se basant sur les antigènes complémentaires associés à la surface cellulaire : dans ce cas les anticorps réagissent contre les constituants des flagelles, poils, paroi cellulaire, membrane cytoplasmique, capsule ou membrane externe.

L'utilisation d'anticorps produits contre les enzymes purifiées pour évaluer la ressemblance structurale entre protéines homologues provenant de différentes bactéries.

Durant ces dernières années la sensibilité et le pouvoir résolutif de la techniques immunologique ont beaucoup évolué grâce aux procédures de marquage radioactif (radioimmunologie) et à l'usage d'anticorps secondaires conjugués aux enzymes. (Benguedouar, 2000).

❖ **La lysotypie**

Procède de la reconnaissance de récepteurs de surface par les bactériophages. C'est un marqueur dont l'utilisation est limitée aux bactéries lysables par une série de phages qui ont été caractérisés. Il existe par exemple, pour *Staphylococcus aureus* un lot de phages internationaux. De *S. aureus* isolées au cours d'épidémies hospitalières. Elle consiste à soumettre la souche à tester à une série de 23 bactériophages. La lyse de la souche par un bactériophage est conditionnée par l'existence au niveau de la paroi d'un récepteur spécifique pour ce phage (Lelliotta et Dickey, 1984).

Protéinotypie, sérotypie et lysotypie sont surtout d'excellents marqueurs épidémiologiques (Fauchere, 1997).

❖ **Surface cellulaire et antigène associé**

Il s'agit d'isoler des anticorps contre des antigènes spécifiques de surface d'une cellule A. De les marquer, les conjuguer avec une particule électrodense, de manière à les rendre visible et enfin de les tester sur des cellules B, C, D... L'antigène correspondant de ces cellules réagit avec l'anticorps, cette réaction est mise en évidence par une autoradiographie ou une observation au microscope à transmission électronique (Benguedouar, 2000)

❖ **Analyse immunocomparative des protéines homologues**

L'usage des anticorps contre les protéines purifiées d'une souche peut être utile pour déterminer la présence, dans les extraits bruts, d'autres bactéries si celles-ci possèdent la même structure protéique dans différentes souches est un indice d'une taxonomie proche. Les études comparées sur les protéines purifiées à structure primaire commune indiquent une corrélation très élevée entre la ressemblance immunologique et le pourcentage de sites de substitution d'acides (Benguedouar, 2000). Les études sur l'homologie sérologique des protéines sont assez limitées : L'approche est utile pour l'étude de protéines avec homologie de séquence relativement élevée inférieure à 70%. Les techniques sérologiques mesurent les similarités uniquement à la surface de protéine dans laquelle l'anticorps doit pouvoir se lier à la structure antigénique. Les résultats peuvent être aussi influencés par le nombre de sites antigéniques reconnus (Benguedouar, 2000).

❖ **L'hémolyse**

Lorsque certaines bactéries se développent sur de la *gélose* au sang, chaque colonie s'entoure d'un **halo** ou le milieu est modifié, soit que les érythrocytes y aient été lysés, soit que le sang y ait été décoloré. Ce phénomène s'appelle l'hémolyse et est du l'action de protéines (les hémolysines) libérées par les bactéries. Certaines espèces donnent une hémolyse incolore, transparent qui contraste nettement avec le milieu rouge opaque. C'est le cas pour *Streptococcus pyogenes* (Singleton, 2004). Pour une bactérie hémolytique donnée, l'hémolyse ou une forme particulière de l'hémolyse ne peut se manifester que si l'organisme a été cultivé sur des milieux préparés avec du sang d'un type d'animal spécifique (Singleton, 2004).

6-1-3- Chimio taxonomie

Les méthodes phénotypiques incluent également les techniques chimiotaxonomiques. Le terme « chimiotaxonomie » se rapporte à l'application des méthodes analytiques pour rassembler l'information sur divers constituants chimiques de la cellule pour classer les bactéries (Vandamme et coll., 1996).

Depuis quelques années le développement des méthodes analytiques et moléculaires a permis aux scientifiques de réaliser une classification des micro-organismes selon des caractéristiques biochimiques basées sur l'étude de trois grandes classes principales de molécules. Les métabolites primaires, composés nécessaires aux fonctions vitales de l'organisme et les métabolites secondaires tels que les alcaloïdes ou les terpènes, qui n'ont pas de fonctions vitales et derniers classe, les samanides qui portent l'information génétique, acide désoxyribonucléique (ADN), acide ribonucléique(ARN) et protéines (Frédéric, 2004)

Actuellement, la combinaison de diverses caractéristiques telles que les caractéristiques morphologiques comme la forme et la taille cellulaire, physiologiques, métaboliques, écologiques et moléculaire permet la classification et l'identification correct non seulement des bactéries et des levures mais aussi des moisissures. La chimio taxonomie, partie intégrante de la démarche, comprends les méthodes moléculaire et les méthodes chimiques (Frédéric, 2004).

6-1-3-1-Composition de la paroi cellulaire

La majeure partie des bactéries sont entourées d'une enveloppe cellulaire qui maintient la forme et prévient la plasmolyse. Ces enveloppes sont constituées de différentes classes d'hétéropolymères particuliers qui permettent la distinction entre microorganismes. Le précurseur des méthodes d'étude est la coloration de Gram qui permet de distinguer les Eubactéries sur la base de la capacité de leur paroi de retenir l'iode-cristal violet en présence d'alcool, en deux groupes : Gram négatif et Gram positif (Benguedouar, 2000). Il existe d'autres techniques pour analyser les différents polymères de la paroi tel que les acides teichoïques qui peuvent être facilement extraits et purifiés par la chromatographie gaz-liquide (Benguedouar, 2000).

6-1-3-2- Polysaccharides

L'analyse de la composition en polysaccharides présente surtout un intérêt pour la détermination de l'espèce : c'est le cas des *Actinobacteria*. Les polysaccharides les plus étudiés sont ceux des espèces du genre *Streptococcus* qui possèdent des antigènes de paroi (Larpent, 2000).

6-1-3-3- Peptidoglycanes

La partie glucidique est très conservée entre les différents micro-organismes. Le peptidoglycane est très répandu aussi bien chez les bactéries à Gram+ que chez les bactéries à Gram-. Seuls les mycoplasmes, les *planctomyces*, les *chlamydiae* et les archéobactéries en sont dépourvues. Du fait de la grande variété structurale, c'est un très bon marqueur taxonomique.

Une vingtaine d'enzymes sont impliquées dans sa synthèse et de sa structure permet la différenciation des genres, espèces et sous-espèces (Larpent, 2000).

6-1-3-4- Composition lipidique

Déjà à partir de la structure de base des lipides, on peut distinguer les Archaeobactéries de tous les autres organismes, en effet leurs lipides contiennent des chaînes latérales isoprénoides avec des liaisons éther (isoprenyl-glycérol-ether) à la différence des autres organismes (Eucaryotes) à chaînes hydrocarbures avec liaison type ester (ester de glycérol et d'acides gras) (Benguedouar, 2000).

Les lipides Eubactéries comprennent de nombreuses et différentes classes dont quelques unes ont un potentiel chimio taxonomiques, à l'exemple des glycolipides moins répartis que les phospholipides (Benguedouar, 2000).

Les acides gras sont les composants majoritaires des lipides cellulaires. Etant donné la variabilité de longueur de leur squelette lipidique, de la position de la double liaison ou aussi la variabilité des groupes de substitution présents sur leur chaîne, leur utilisation en taxonomie de procaryotes donné de bons résultats (Frédéric, 2004). La composition en acides des lipides cellulaires, obtenue par chromatographie en phase gazeuse, est extrêmement utile à des fins taxonomiques. Si les conditions de croissance composition du milieu de culture, température d'incubation, l'âge de la culture et les techniques analytiques appliquées sont maintenues constantes, le profil des acides gras intracellulaires peut servir pour différencier les organismes strictement corrélatifs (Benguedouar, 2000).

Plusieurs types de lipides insaponifiables sont étudiés en chimio taxonomie : les ubiquinones, les stéroïdes et les caroténoïdes. Les ubiquinones font partie des lipides terpéniques et sont des constituants des membranes mitochondriales des eucaryotes. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans le métabolisme, notamment lors du transfert d'électrons dans la chaîne du système respiratoire sont utilisées en chimio taxonomie car leur structure varie en fonction du taxon (Frédéric, 2004)

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. La majorité des bactéries à Gram négative aérobies strictes produisent uniquement les Ubiquinones, les Gram négatif, anaérobies facultative contiennent des Ubiquinones, des Mena quinones, de Dimethylmenaquinones ou la combinaison des trois. Les bactéries à Gram négatif anaérobies strictes produisent seulement des Mena quinones. La majeure partie des Gram positif aérobies et anaérobies facultatifs secrètent la seule Mena quinone. Les données disponibles font ressortir que les Mena quinones ont une valeur plus discriminatoire que les Ubiquinones. Quant à leur implication dans la taxonomie (Benguedouar, 2000).

6-1-3-5- Composition cytochronique

Les cytochromes sont une forme particulière d'hémoprotéines dans les réactions redox. Selon la structure de leur groupement prosthétique hémique, on les classe comme cytochromes a, b, c et d (Benguedouar, 2000).

Deux méthodes disponibles sont basées sur l'utilisation des cytochromes comme moyen de classification et identification des bactéries : l'approche des profils et l'approche structurale. La première compare les profils cytochromiques des diverses espèces bactériennes mettant à profil leur différence de réponse spectrophotométrique; la seconde compare la structure primaire et, si possible, la structure secondaire des cytochromes c purifiés, déterminées par le séquençage de leurs acides aminés ou la diffraction aux rayons X (Benguedouar, 2000).

6-1-3-6- Séquence d'acides aminés des 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.

En comparant certaines protéines (telles que la su peroxyde dismutase, la ferrédoxine, le cytochrome c et autres) provenant de diverses bactéries, plus grande est la différence dans leur séquence en acides aminés et plus grande devrait être la distance génétique entre les microorganismes. A l'inverse, si la séquence en acides aminés correspondant aux protéines de deux microorganismes sont très similaires, les deux souches sont phylogénétique ment proches (Benguedouar, 2000).

6-1-3-7- Profils protéiques

Dans des conditions expérimentales rigoureusement standardisées, les organismes strictement apparentés montrent protéines cellulaire similaires ou identiques:

Les procédures d'électrophorèse bidimensionnelle ou l'isoélectrofocalisation ont rendu possible la résolution de centaines de protéines d'extraits (électrophorégrammes) (Benguedouar, 2000).

L'exemple de *E.coli* où un gel bidimensionnel a mis en évidence jusqu'à 1700 bandes protéiques et de celles-ci plus de 200 sont déjà identifiées dont des enzymes et protéines structurales. L'électrophorégramme d'une souche peut être comparé à celui d'une autre souche en faisant appel à l'analyse informatique d'image, qui permet une mesure de correspondance reflétant le degré de parenté (Benguedouar, 2000).

6-1-4- Taxonomie numérique

Elle évalue une similitude générale en comparant de nombreuses caractéristiques ayant chacune le même poids (morphologique, physiologique, biochimique). La forme d'utilisation des propriétés biochimiques permet leur analyse numérique. L'existence de quelques caractères atypiques n'est ainsi pas un obstacle à l'identification. L'ordinateur calcule les similitudes entre les individus, et regroupe les individus qui ressemblent en phénons (Geraldine et Delphine, 2003)

L'établissement de la structure taxonomique se fait à l'aide de programme d'agrégation (cluster analysis) qui évalue la ressemblance entre les souches en calculant un indice numérique pour former des groupes d'individus, il faut tenir compte de leurs ressemblances mais aussi de ce qui les différencie des autres qui ne seront pas inclus dans le groupe. Or, deux souches bactériennes ne sont jamais totalement semblables ni totalement différentes (Geraldine et Delphine, 2003).

La quantification des similitudes et des différences permet de caractériser les taxons :

- coefficient de similitude = $a / a + b + c$
- coefficient d'égalité = $a + d / a + b + c + d$

a = caractères + dans les deux souches

b = caractères + dans la souche 1 et - dans la souche 2

C = caractères - dans la souche 1 et + dans la souche 2

D = caractères - dans les deux souches.

Les distances taxonomiques entre tous les individus pris deux à deux sont calculées grâce à l'indice de Jaccard-Sneath : $S_j = a / a + c$ (Singleton, 2004).

Cette méthode implique le choix de caractères indépendants et non redondants, la mise sur pied d'égalité des divers caractères biochimiques sans idées préconçues de hiérarchisation, la standardisation de la méthode (Larpent, 2000)

Cette standardisation exige d'utiliser toujours un volume identique pour l'inoculum (échelle de Mac Farland), un milieu de culture standard, des temps de lecture très précis, l'analyse de la fiabilité de la méthode, un grand nombre de souches provenant du monde entier (Larpent, 2000).

Les analyses en taxonomie numérique sont souvent résumées en un dendrogramme. Les groupes microbiens sont appelés phénons (Larpent, 2000)

La taxonomie numérique utilise une matrice de données qui contient, pour chaque taxon, la valeur de fréquence de positivité (f) des différents tests exprimée en pourcentage. La souche à identifier est soumise aux plus grand nombre de tests possibles : si la réponse est positive, on retient la valeur de fréquence de positivité f de la matrice de données, si elle est négative, on retient une valeur calculée en soustrayant f de l'unité. Le produit de toutes ces valeurs donne la fréquence théorique du phénotype étudié dans l'espèce. Cette fréquence théorique divisée par la somme des fréquences théoriques obtenue pour tous les taxons soumis à comparaison fournit un coefficient qui multiplié par 100 donne le pourcentage de chances qu'a la souche testée d'appartenir à l'espèce. On accepte généralement les seuils suivants :

- > 99,9 % : excellente identification
- > 99 % : très bonne identification
- > 90 % : bonne identification
- > 80 % : identification acceptable
- < 80 % : identification à rejeter (Cuq, 2007).

La taxonomie numérique moderne s'est développée à la fin années 50 parallèlement au développement de l'informatique. C'est en 1963 qu'elle devint opérationnelle. Dont l'objectif était d'élaborer des méthodes de base pour la taxonomie des microorganismes, les bactéries en particulier. Les méthodes numériques ont permis d'augmenter la précision dans l'évaluation des relations taxonomiques, phylogénétiques, sérologiques...et ont autorisé l'intégration des

données de différents types (morphologiques, physiologiques, antigéniques,...(Benguedouar, 2000).

L'application des concepts de la taxonomie numérique, basés sur de longs calculs mathématiques, n'a été possible qu'avec le développement de l'informatique permettant ainsi de minimiser les erreurs dans l'évaluation des paramètres pris en considération. Pour cela, il est nécessaire de résoudre deux problèmes :

1-Sémi-similitude (ou ressemblance) basée sur l'observation des propriétés exprimées par les proportions entre affinité et différence ou rapport phénétique qui comprend la similarité phénotypique (ex : mobilité) et génotypique (ex : homologie de l'ADN).

2-Rapport d'ascendance ou rapport d'évolution : on se réfère ici à la phylogénèse des organismes (affinité parentale), en fait c'est l'expression de la quantité des variations survenues dans une grande ligne évolutive. La taxonomie numérique cherche à définir la taxospécie (groupe de souches dotées d'une grande ressemblance phénétique réciproque) qui, dans la nomenclature se distingue de la géospécie et de la nomenspécie (Benguedouar, 2000).

Les groupes objets d'un système taxonomique sont de deux types : Les monothétiques, définis comme groupes sans exception, possédant des propriétés invariables (ex : tous les triangles ont trois cotés). Les groupes taxonomiques n'appartiennent pas à ce type (Benguedouar, 2000). Les polythétiques, définis comme groupes ou les exceptions dans les caractères sont toujours possibles et la taxonomie numérique tient compte de ce type, dans la mesure où il existe une grande proportion de caractères communs mais pas nécessairement invariables (Benguedouar, 2000).

6-1-4-1-Principales données pour la taxonomie numérique

❖ Microorganismes

La majeure partie des études taxonomiques sur les bactéries consiste à examiner individuellement les souches. Toute fois entités à une classification, peuvent être de nature diverse : souche, espèce, genre. Pour remédier à cette hétérogénéité, les entités, dont le nombre est indiqué par la lettre *t*, sont appelées unité taxonomique opérationnelle (OTUs). Dans la majeure partie des travaux sur les OTUs sont des souches, par conséquent une étude de taxonomie numérique doit contenir une vaste sélection de souches des groupes à l'étude,

donc une corrélation souche-type/taxa. Il est possible que peuvent être comprises les souches récemment isolées et provenant de toutes les régions du monde.

❖ **Caractères**

Un caractère est défini comme une propriété quelconque qui peut varier entre les OTUs et les valeurs affectées sont les états du caractère (ex : la longueur d'une spore est un caractère, 1,5 μm est un état de caractère). Il est important de comparer le même caractère pour les différents microorganismes et la reconnaissance de deux caractères permet la détermination d'une homologie. Un seul caractère traité indépendamment des autres est défini comme caractère-unité, un groupe de caractères corrélatifs est défini comme caractère-complexe.

❖ **le nombre de caractères n**

Utilisé dans les études de taxonomie numérique, il influence considérablement l'authenticité des résultats. En effet, arriver à un résultat significatif ce nombre devrait être égal ou supérieur à 50. Il serait idéal de disposer d'une centaine de caractères ce qui améliore encore mieux l'étude de la taxonomie.

❖ **Qualités des données**

Les données microbiologiques sont, comme toutes les données expérimentales, affectées d'erreurs ; la différence moyenne dans les tests des tests de reproduction sur le même échantillon est généralement de l'ordre de 50%. Les tests doivent être ainsi conduits selon un mode rigoureusement standardisé quoi qu'il soit toujours difficile d'obtenir des résultats reproductibles.

❖ **Codification des données**

De ce point de vue les réactions de multiples tests et les différents états de caractères doivent être exprimés en N pour l'analyse numérique. Ce sont différents procédés, dont le plus commun exprime les résultats comme positifs ou négatifs (Benguedouar, 2000).

6-1-4-2- Dendrogramme

Le dendrogramme est une représentation des résultats qui permet de faire apparaître des groupes taxonomiques (Geraldine et Delphine, 2003). C'est un diagramme fréquemment utilisé pour illustrer l'arrangement de groupes générés par un groupement hiérarchique ou hiérarchisant. sont par exemple souvent utilisé en biologie pour illustrer des regroupements de gènes ou des filiation (arbre phylogénétique mais aussi dans de nombreux autres domaines utilisant des notions de regroupement hiérarchique (1).

Le dendrogramme est une figure arborescente. Si, dans sa construction, l'on introduit l'hypothèse que les ressemblances sont le reflet d'une relation de parenté, le dendrogramme est généalogique ; si l'on introduit celle que les ressemblances évoluent au cours du temps, le dendrogramme est phylogénétique (Généromont, 1996).

L'objectif de recherche est souvent double ; dans un premier temps, il s'agit de mettre en évidence sur un schéma synthétique (le dendrogramma) les relations généalogiques ou évolutives entre plusieurs taxons ; dans un second temps, d'apprécier leur degré de divergence. Ce dernier es estimé en fonction soit du temps qui sépare es taxons, soit des différences génétiques, moléculaires ou autres accumulées entre ces mêmes taxons (Généromont, 1996). Le dendrogramme est très peu significatif, dans la mesure où les groupes de bactéries ne sont pas distincts (Torche, 2006)

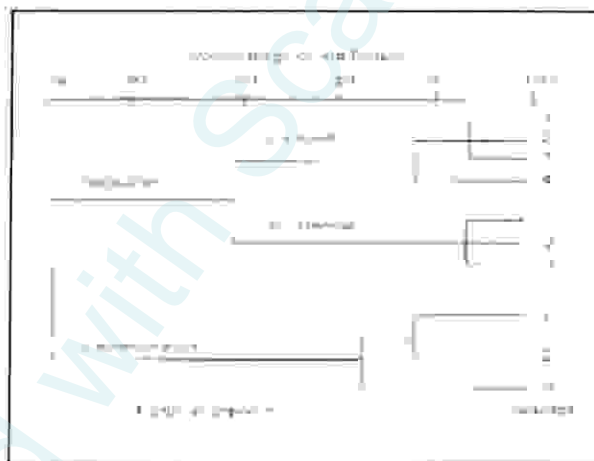


Figure 05: Un dendrogramme résulte d'analyse de taxonomie numérique (Geraldine et Delphine, 2003)

6-1-5- limites de la classification phénotypique

Les techniques phénotypiques ne sont pas adaptées au diagnostic des bactéries dont la culture est lente ou difficile ou aux germes non cultivables puisque la condition initiale est disposée d'une culture pure de l'espèce à identifier. D'autres limites proviennent des tests en eux-mêmes et leur nombre limité, même si l'identification numérique en a considérablement amélioré les performances (Geraldine et Delphine, 2003).

Elles ne représentent qu'une faible partie du phénotype des bactéries. Même en multipliant le nombre de caractères étudiés (jusqu'à 300 parfois), la taxonomie numérique n'évalue que 5 à 20 % du potentiel génétique d'une bactérie. De plus, le développement de ces tests s'est fait par analogie avec des faits réels (Geraldine et Delphine, 2003).

Certains facteurs (climat, géographie), peuvent intervenir et être responsable de grandes modifications dans l'identification. Les origines (cliniques, vétérinaires, environnementales, agro-alimentaires et géographiques) conditionnent dans une certaine mesure le choix des propriétés biochimiques testées. Attention une souche représentative d'une espèce rencontrée aux USA peut avoir des propriétés biochimiques ou une distance génétique différente par rapport à d'autres souches, de la même espèce, isolées en Europe (Busse et al . , 1996).

Les tests peuvent aussi être erronés par : la variation du phénotype par la présence ou l'absence d'un plasmide codant pour des fonctions métaboliques , la variation de la taille de l'inoculum et la durée d'incubation , des profils différents entre des souches récemment isolées et celles qui sont conservées de puis longtemps , critères différents pour les bactéries d'un environnement différent(bactéries à intérêt biomédical par rapport aux bactéries de l'environnement par exemple), expression différente des caractères phénotypiques selon la température , la composition du milieu de culture , systèmes spécifique à des taxons particulier (par exemple les entérobactéries) et qui ne peuvent s'appliquer aux autres bactéries (Geraldine et Delphine, 2003) .

6-2-Taxonomie moléculaire

6-2-1-Définition et critères

Les méthodes moléculaires (génotypiques) sont ceux orientées sur les molécules de l'ADN ou l'ARN, sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc.). Ces méthodes basées sur l'étude d'un gène (locus), d'un fragment d'ADN défini de plusieurs gènes (multi loco) ou encore de l'ADN total, dépendant du but poursuivi (Frédéric, 2004 ; Torche, 2006).

Initialement la taxonomie bactérienne était basée sur de simples caractères morphologiques et métaboliques, mais de telles méthodes ne permettent de distinguer que les

microorganismes superficiellement similaires mais ne déterminent pas les rapports phylogénétiques entre individus et groupes.

Le développement de la biologie moléculaire a ouvert la voie à de nouvelles approches pour la classification des organismes qui a eu un impact profond sur la taxonomie bactérienne, permettant ainsi de clarifier la position taxonomique non seulement des souches strictement corrélatives (réf: à l'homologie ADN/ADN), mais aussi des bactéries très distinctes (Séquençage du ARNr 16S). L'information génotypique dérive des acides nucléiques (ADN, ARN) présents dans les cellules et les principaux avantages qu'on peut obtenir avec la classification basée sur les relations génétiques.

Les techniques caractérisant le génotype fournissent une base réellement objective par la variabilité de l'espèce bactérienne. La classification basée sur les caractères génotypiques n'est pas influencée par la variabilité environnementale. De ce fait, il est possible d'acquérir des informations du type évolutif permettant une classification phylogénétique des bactéries (Benguedouar, 2000).

Les progrès réalisés dans la connaissance de l'ADN bactérien permettent des comparaisons beaucoup plus fines entre les bactéries et une classification plus rigoureuse.

Trois critères sont classiquement recherchés :

- Le GC % au coefficient de Chargaff
- Le taux d'hybridation ADN/ADN
- La séquence des ARN ribosomiaux 16S et 5S (Deley et Tijtgat, 1970).

6-2-1-1-La composition en bases de l'ADN (G+C %)

La première caractéristique de l'ADN connue pour avoir une importance taxonomique fut son contenu en pourcentage molaire en guanine + Cytosine (G+C %).

Le rapport $(G+C) / (A+T)$ varie amplement dans l'ADN provenant de différents microorganismes. Chez les bactéries la valeur du mol % G+C se trouve dans l'intervalle de 24 à 76% et la valeur est constante pour le même microorganisme (Johnson, 1985). Les souches qui présentent une différence du contenu mole % G+C de plus de 3% ne peuvent être regroupés dans la même espèce, et pour une différence supérieure à 10% elles ne sont plus issues du même genre (Benguedouar, 2000).

❖ Méthode de la dénaturation thermique

Le GC % est déterminé par mesure de la température de fusion T_m de l'ADN. En chauffant une solution d'ADN, les liaisons hydrogènes sont rompues. Parallèlement la DO à 260 nm augmente selon une sigmoïde. Le point d'inflexion de la courbe détermine le T_m où 50% de l'ADN est sous forme simple brin. Le T_m est d'autant plus élevé que le GC% est grand (Geraldine et Delphine, 2003).

en 1949, Chargaff montre ce paramètre est constant au sein d'une espèce

Moins de 5 % de différence : même espèce

Moins de 10 % de différence : même genre (Geraldine et Delphine, 2003).

❖ Méthode au gradient de CsCL

La valeur mole % C+C' peut être aussi déterminée en centrifugeant un échantillon d'ADN sur gradient de densité de chlorure de Césium, la densité relative à la position des bandes d'ADN est directement proportionnelle au contenu des paires de bases GC (Benguedouar, 2000).

6-2-1-2-Hybridation moléculaire

❖ Hybridation ADN/ADN

Cette technique permet de comparer la totalité du génome bactérien et d'estimer le degré d'homologie entre deux bactéries. En effet, si l'ADN dénaturé est maintenu à une température inférieure au T_m de 25°C à 30°C, il peut réassocier en fonction du degré d'homologie existant entre les deux chaînes.

Si on sépare les deux brins d'ADN de 2 souches, et qu'on essaye de rapprocher 2 brins hétérologues (chacun provenant d'une souche), le degré de réappariement (exprimé en % d'ADN réapparue) est directement lié à la proximité taxonomique des deux souches.

En pratique, on extrait l'ADN des deux souches à comparer (l'une de ces souches a son ADN préalablement marqué par un élément radio-actif), on dénature par la chaleur les ADN double brin en ADN simple brin, et on met en présence les brins hétérologues. Après renaturation, on mesure le pourcentage d'ADN hybride.

Deux souches appartenant à la même espèce ont un pourcentage d'hybridation ADN/ADN $\geq 70\%$. Ce réappariement aboutit à un ADN double brin qui contient moins de 5% de séquences non complémentaires.

Le pourcentage d'hybridation ADN/ADN et la stabilité thermique de l'hybride sont utilisés pour décrire l'espèce. La valeur d'hybridation ADN/ADN est un indicateur de la similarité des séquences entre génomes entiers (De ley et al., 1970).

Plusieurs techniques d'hybridation ADN/ADN ont été décrites, mais les plus couramment utilisées sont les méthodes sur l'hydroxyapatite (Brenner et al., 1969).

Les hybridations ADN-ADN sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. Dans les techniques classiques l'un des ADN est généralement marqué par un isotope radioactif ou par une enzyme afin de reconnaître la provenance de chaque brin d'ADN dans les hybrides. Les techniques plus modernes ne nécessitent pas de marquage tel que les techniques spectrophotométriques.

L'hybridation entre ADN hétérologues permet de déterminer les relations de parenté entre microorganismes relativement proches, même au niveau intra génétique. Deux organismes sont considérés appartenant à la même espèce si, dans les conditions standards de renaturation, leur taux d'homologie de séquence est inférieur à 70% (Benguedouar, 2000).

❖ Hybridation ADN/ARN

On peut employer l'hybridation ADN-ARN pour déterminer le degré de parenté entre l'ADN d'un organisme et l'ARN d'un second organisme de la même façon qu'on utilise l'hybridation ADN-ADN (Torche, 2006).

Elle est surtout utilisée pour obtenir des informations phylogénétiques permettant d'apprécier les différences entre organismes assez distants. Les valeurs d'homologie sont spécifiques pour chaque type d'ARN, pour des raisons techniques, dans les essais de réassociation ADN : ARN il est préférable d'utiliser le ARNr ou en second lieu l'ARNt (l'ARNm est instable). Dans les deux cas, ces ARN codent pour une petite fraction du génome bactérien ce qui stabilise l'homologie génétique entre deux souches bactériennes à de petits segments spécifiques du chromosome (Benguedouar, 2000).

6-2-1-3-Etude des ARNr

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 purifiées.

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 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 connu pour environ 4000 souches et est accessible par interrogation de bases de données. 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 bactérie 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 (Geraldine et Delphine, 2003)

❖ Etude de l'homologie des ARNr

Le développement progressif de nouvelles techniques moléculaires fait appel de se concentrer sur l'étude comparative des molécules de l'ARNr.

Initialement on commença par déterminer la séquence du ARNr 5S, mais s'agissant d'une petite molécule et donc d'une faible valeur informationnelle, pour cela, et à des fins taxonomiques, sont plus utiles les séquences des sous unités plus grandes, en particulier la sous unité 16S pour les procaryotes.

Le séquençage des ARNr 16S avec les amorces conservées et les transcriptases reverses était une avance importante dans la phylogénie bactérienne et eu comme conséquence une augmentation spectaculaire des séquences de l'ARNr 16S.

Le séquençage direct des parties ou des molécules presque entières d'ARNr 16S ou 23S est réalisé en employant la technique de la PCR avec le choix des amorces appropriés.

L'ARNr présente les caractéristiques utiles pour déterminer les rapports phylogénétiques entre les bactéries : dans une cellule de *E.coli* en pleine croissance se trouvent environ 15000 ribosomes constituant le quart de la masse bactérienne totale ; universel et essentiel pour la vie d'une même cellule ; sa fonction est conservée dans tous les organismes ; dans la molécule coexistent des régions assez variables avec d'autres hautement conservées qui ne peuvent facilement muter d'où perte de leur fonction. les restrictions auxquelles sont soumises les régions conservées sont dues au fait que le ARNr doit assumer une structure secondaire bien définie devant interagir avec différentes protéines pour former un ribosome fonctionnel, les gènes qui le codent sont présents en multiples copies d'où la mutation dans l'une d'elles se répercute sur les autres, est une grosse molécule qui peut fournir beaucoup d'informations (Benguedouar, 2000).

La comparaison de la séquence en nucléotides des molécules d'ARNr 16 S permet d'évaluer le degré de parenté entre les organismes. Il existe pour cela plusieurs techniques : catalogue d'oligonucléotides, clonage des gènes codants, la synthèse d'ARN ribosomique, transcription inverse à partir de la molécule d'ARN (Larpent, 2000).

6-3-Taxonomie phylogénique

6-3-1-Définition et critères

Idéalement, une classification biologique (taxinomique) devrait être phylogénétique, c'est-à-dire basée sur les relations naturelles entre les organismes supérieurs, chez qui les bactéries, cependant, aussi ont-elles été traditionnellement classées selon des caractères observables (phénotypiques) du genre.

Depuis la seconde moitié du XXe siècle la classification traditionnelle a été de plus en plus remplacée par la classification phylogénétique qui est uniquement basée sur le modèle évolutif et la notion d'ascendance commune (phylogénie) (Tifrit, 2010).

La classification phylogénétique est basée sur les rapports héréditaires entre les bactéries encodés par les données des séquences de l'ARNr 16S ou 23S. L'ARNr est la meilleure cible pour étudier les rapports phylogénétiques parce qu'il est présent chez toutes les bactéries, fonctionnellement constant et se compose de domaines fortement conservés ainsi que plus variables.

6-3-2-Arbre phylogénétique

Un arbre phylogénétique propose une hypothèse pour les rapports évolutifs entre des objets taxon ou unité taxonomiques opérationnelles (Zvelebil et Baum, 2001). Est une représentation graphique de la phylogenèse d'un groupe de taxon. Les nœuds externes représentent les unités taxonomiques et les branches définissent les relations entre les taxa en terme de descendance les nœuds internes représentent des ancêtres hypothétiques. (Darlu, et tassy, 1993).

La racine d'un arbre phylogénétique Indique la position de l'ancêtre commun de tous les taxa présents dans l'arbre. Les méthodes d'analyse phylogénétique reconstruisent des arbres non-enracinés. La position de la racine est arbitrairement déterminée sur la donnée fossile ou autre.

6-3-2-1-Les types d'arbres phylogénétiques

En général il ya trois types : les cladogrammes, les arbres additifs et les arbres ultra métriques

❖ Le cladogramme

Montre la ligne de la descente du taxa, mais ne dit rien du chronométrage ou la mesure de divergence. La longueur des branches n'a aucune signification, seulement la topologie est importante (Zvelebil et Baum, 2001).

❖ Un arbre additif

Montre les lignes de descentes et aussi les longueurs des branches, les longueurs des branches donnent d'information évolutive quantitative, ce qui peuvent être proportionnelle au nombre de mutations entre les nœuds. La distance évolutif total entre les taxa est donnée par la somme de toutes les longueurs des branches (Zvelebil et Baum, 2001).

❖ **Un arbre ultra métrique**

Est comme un arbre additif et en même temps le taux de mutation est constant le long de chaque branche de l'arbre. Cette propriété est appelé l'horloge moléculaire, les arbres ultra métriques ont toujours une racine et un axe de l'arbre est directement proportionnel du temps. La distance évolutive entre la racine et les feuilles de l'arbre est la même pour tous les taxons (Zvelebil et Baum, 2001).

6-3-2-2- Méthodes générales des arbres phylogénétiques

Le choix de la méthode dépend sur la taille de la collection de données et leurs qualités.

- ❖ **Méthodes de groupement** construit les arbres graduellement, commençant d'un nombre limité de séquences.
- ❖ **Méthodes de recherche topologique** produisent une collection d'arbre et utilise des mesures de qualité pour comparer les arbres aux données (Zvelebil et Baum, 2001).

6-3-2-3-L'arbre condensé et consensus

Plusieurs arbres peuvent être construit par des méthodes différentes ou par des méthodes qui peuvent produire plusieurs arbres, pour choisir le meilleur arbre on doit besoin d'une méthode pour comparer les topologies des arbres différents.

Quand on enlève tous les partitions qui n'ont pas assez de support dans les arbres différents, en crée un arbre condensé. On peut aussi récupérer les caractéristiques qui sont observées dans tous les arbres Dans ce cas, l'arbre est appelé un arbre consensus (Zvelebi et Baum, 2001).

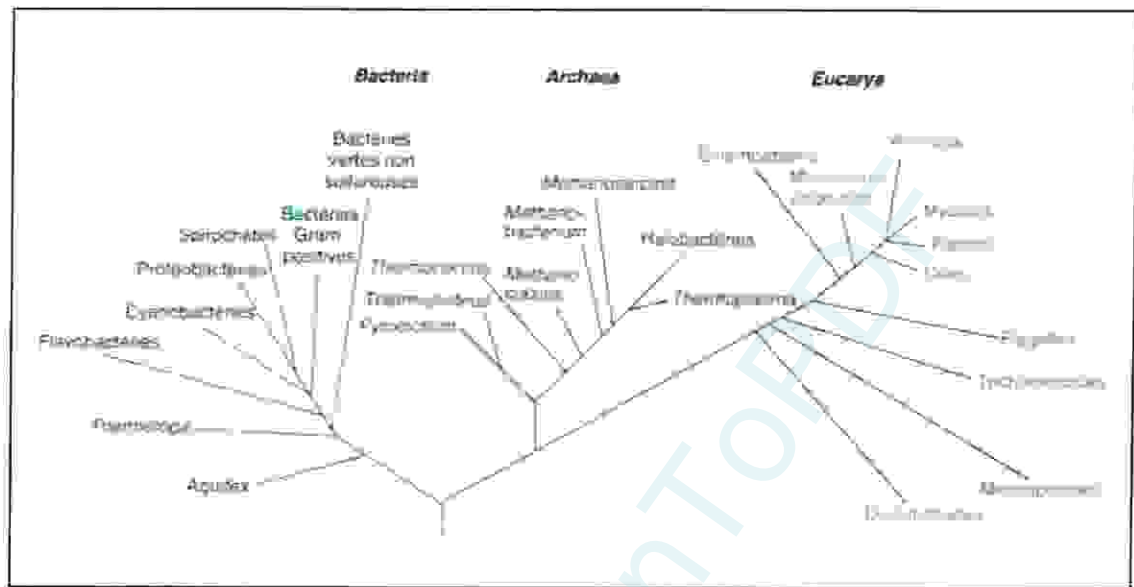


Figure 06 : l'arbre phylogénique universel. Ces relations ont été établies par comparaison des séquences d'ARNr (Olsen et Woese, 1993).

7- Méthodes utilisées pour l'identification moléculaire

7-1- Méthodes électrophorétiques de l'analyse de l'ADN

Les méthodes utilisées ont pour technique commune l'électrophorèse de l'ADN principalement différenciées par : le profil de l'ADN plasmidiques, l'électrophorèse à champ pulsé de l'ADN génomique, l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction. De ces méthodes ressortent des profils électrophorétiques qui, en les comparant dans les mêmes conditions expérimentales, contribuent à l'identification de diverses souches (Benguedouar, 2000).

7-1-1-Profil plasmidique

Les bactéries, en plus du chromosome, peuvent contenir un certain nombre de plasmides : molécules d'ADN circulaire à double hélice, capable de répllication autonome à l'intérieur de l'hôte bactérien, et portent un ou plusieurs gènes. Le profil plasmidique d'une bactérie met en évidence le nombre et la taille approximative des plasmides présents (Benguedouar, 2000).

7-1-2-Electrophorèse sur champ pulsé

L'électrophorèse en champ électrique distingué ou pulsé (Pulsed Field Gel Electrophorèse) permet de séparer des molécules d'ADN à poids moléculaires élevés (50 Kb à plusieurs Mb).

Le principe de cette technique est que la molécule d'ADN est soumise à la présence de deux champs électriques, différemment orientés, et qui s'orientent alternativement chacun pour un même intervalle de temps, dit le champ électrique peut présenter différentes configurations parmi lesquelles un système des plus utilisés, le CHEF, ou la cuve électrophorétique est délimitée d'un profil hexagonal d'électrodes qui déterminent un angle de 120 degré (Benguedouar, 2000).

7-1-3-Polymorphisme des longueurs de fragments de restriction (RFLP)

Cette méthode se base sur l'observation du polymorphisme des longueurs des fragments obtenus après digestion de l'ADN par les enzymes de restriction. L'ADN des souches à étudier est digéré par des endonucléases de restriction puis soumis à un gel électrophorétique et ensuite transféré sur une membrane (nylon ou nitrocellulose) et enfin hybridé avec une sonde adéquate. La variabilité entre les souches pour les zones sondées est mise en évidence à partir du profil d'hybridation (Benguedouar, 2000).

7-2- Méthodes basée sur la PCR

Pour éviter les procédures onéreuses et laborieuses d'hybridation avec les sondes marquées et les banques génomiques, on procède à l'application de la réaction en chaîne de la polymérase (Polymerase Chain Réaction ou PCR) qui consiste en un processus d'amplification enzymatique de la séquence spécifique de l'ADN en partant d'une copie d'oligonucléotides complémentaires à un fragment qu'on veut amplifier pour la réaction de polymérisation. La réaction d'amplification prévoit une série de cycles, chacun comprenant la dénaturation de l'ADN à amplifier, l'appariement des oligonucléotides à la séquence complémentaire.

Le problème d'adopter la technique de PCR classique est la nécessité d'avoir des informations détaillées sur la séquence à amplifier pour pouvoir être en mesure de choisir l'amorce (primer) opportune. Pour pallier à cela fut développée une technique en mesure de

mettre en évidence le polymorphisme basé sur l'amplification de l'ADN amorcée à partir de primer fortuit (Benguedouar, 2000).

7-2-1-Typage

La méthode de typage doit être discriminante c'est-à-dire permettre dans un minimum de 95% des cas à identifier deux souches identiques. Elle doit également être spécifique et reproductible (Bosi, 1996). Cette méthode permet de trouver une correspondance entre une souche inconnue et une souche connue d'une espèce donnée (une forme d'identification), établir des distinctions entre différentes souches d'une espèce donnée (une forme d'identification).

Il faut bien se rendre compte qu'aucun système de typage ne peut prouver qu'une souche inconnue est totalement identique à une souche connue précise bien que le typage puisse indiquer une absence d'identité. Ceci vient de ce qu'aucun système de typage n'est élaboré pour révéler des similarités, ou alors, pour un ou quelques caractères seulement. Ainsi même si une souche inconnue est identique à une souche connue en ce qui concerne ces caractères, elle peut fort bien en différer pour d'autres. Par conséquent, différents systèmes de typage peuvent être employés. Dans le contexte médical ou vétérinaire, le typage a divers usages (Singleton, 2004).

7-2-2 La technique PCR-RFLP

Polymorphisme de taille des fragments de restriction, digestion de l'ADN par des enzymes de restriction et le séquençage précédé d'une PCR sont basés sur l'étude d'un gène ou d'un fragment d'ADN (Frédéric, 2004). Plusieurs auteurs ont utilisé un fragment de l'ADN ribosomal.

L'inconvénient de la PCR-RFLP est qu'elle fournit une information phylogénétique moindre que lors d'un séquençage. Cependant, elle peut être très utile lors d'un criblage d'isolats suspectés appartenir à la même souche ou espèce (Frédéric, 2004).

On peut comparer des séquences de nucléotides apparentées en les traitants par les mêmes enzymes de restriction. Des séquences de nucléotides identiques, clivées par des enzymes données, donneront évidemment des fragments identiques.

Un des problèmes de l'analyse conventionnelle du RFLP réside dans la préparation d'une quantité suffisante de la séquence à analyser. Un autre problème possible vient de la méthylation de l'ADN isolé des cellules : méthylation qui peut affecter l'activité des enzymes choisies pour l'analyse. Ces problèmes peuvent être solutionnés par l'analyse par RFLP-PCR. On commence par choisir une séquence cible spécifique qu'on amplifie par PCR. Le produit amplifié (non-méthylé, puisque synthétisé *in vitro*) est ensuite soumis à l'analyse du RFLP comme décrit plus haut.

Alignant les séquences disponibles, puis digéré par des enzymes de restriction. Cette technique fournit principalement des profils spécifiques. Les fragments de restriction séparés après électrophorèse sont transférés sur une membrane (Southern blot). La membrane est hybridée avec une sonde qui va s'accrocher à un ou plusieurs fragments de restriction. La sonde peut être constituée d'un gène ou d'un fragment de gène (résistances aux antibiotiques, virulence...), d'une séquence inversée ou répétée ou être fabriquée à partir d'un fragment pris.

Au hasard dans le chromosome bactérien. Toutefois, une sonde universelle a été proposée dans la mesure où les ARN ribosomiaux ont gardé une grande stabilité au cours de l'évolution. Il s'agit des gènes codant les ARN ribosomiaux d'*Escherichia coli* ou de *Bacillus subtilis* (Larpen, 2000).

La Restriction Fragment Length Polymorphisme est une analyse de différentes séquences de l'ADN génomique issues d'une hydrolyse par une endonucléase et visualisées après électrophorèse et coloration au bromure d'éthidium. Pour simplifier l'analyse (de très nombreux fragments sont souvent produits). Une hybridation au moyen d'une sonde à reconnaître des régions spécifiques des hydrolysats est réalisée (Ridley et Saunders, 1993 ; Frédéric, 2004).

7-2-3-Technique RAPD ou AP-PCR

La technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) appelée aussi AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) a été introduite en 1990. Le principe de la méthode est d'effectuer des réactions de PCR avec une seule amorce dont la séquence est courte (9 à 10 Pb) et choisie au hasard. Cette méthode est rapide et simple à condition de standardiser les conditions de PCR qui ne nécessitent pas une quantité et une qualité d'ADN élevées (Frédéric, 2004).

7-2-4-Technique REP-PCR

Dans cette méthode, on a recours à la PCR pour obtenir des empreintes, en copiant des séquences particulières du chromosome. La rep-PCR n'est applicable qu'aux bactéries dont le chromosome contient de multiples copies d'une séquence spécifique de nucléotides. Citons la séquence **ERIC** (séquence entérobactérienne, répétitive, inter génique, consensus) et le **SERE** (pour *Salmonella enteridis* répétitive élément). L'abréviation rep-PCR est d'usage générique pour désigner la REP-PCR, l'ERIC-PCR et la SERE-PCR.

Le but de cette méthode est de caractériser des souches bactériennes par des profils électrophorétiques obtenus en amplifiant des séquences répétitives appelées séquences REP.

Cette méthode a été appliquée sur les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* et *Agrobacterium* (Frédéric, 2004). L'étude a montré que des séquences REP sont présentes chez ces bactéries. La REP-PCR a aussi été employée pour beaucoup d'étude de diversité d'isolats de BNL (Frédéric, 2004).

L'avantage de cette méthode est sa simplicité et sa rapidité. Un simple gel d'agarose peut permettre de séparer les fragments d'ADN obtenus. De plus, ces réactions de PCR peuvent donner de bons profils analysables si elles sont réalisées à partir d'un petit nombre de cellules mises en suspension dans le mix de PCR (Frédéric, 2004).

7-2-5- Technique AFLP

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est une approche moléculaire pour explorer le polymorphisme de séquences représentatives d'un génome entier. Elle a été décrite par (Frédéric, 2004).

7-2-6- Technique PFGE

La technique PFGE (Pulsed-Field Gel electrophoresis) (Colrich et al., 1991), est l'analyse de génomes par électrophorèse en champs pulsés après hydrolyse par des enzymes de restriction qui coupent (ce qui va générer de grands fragments). Elle permet la séparation de fragments des génomes bactériens en vue d'une détermination de sa taille mais aussi en vue de typage d'isolats bactériens. Les isolats ayant les mêmes profils PFGE sont considérés comme étant la même souche (Frédéric, 2004).

Le typage par PFGE est considéré comme l'étalon or des méthodes de typage moléculaire. Comparé à d'autres méthodes, il offre souvent un pouvoir de discrimination supérieur.

7-3-Utilisation de méthodes moléculaires pour la microscopie

Le but est de cibler spécifiquement un groupe taxonomique en se basant sur la spécificité des séquences nucléiques. L'hybridation in situ (FISH en anglais) combine les méthodes moléculaires et l'observation microscopique.

L'idée est fixer par hybridation une sonde marquée avec un fluorochrome (sonde = oligonucléotides d'environ 20 bases complémentaire au site choisi) directement sur l'ARN des ribosomes. Comme ils sont nombreux, la bactérie sera fluorescente sous UV (Favet, 2013).

D'autres différentes techniques microscopiques permettent d'obtenir des renseignements sur les bactéries observées sans les cultiver. C'est surtout utile pour les bactéries non cultivables et pour l'observation d'un échantillon mixte (Favet, 2013).

8-Identification des bactéries dans le domaine de la bactériologie clinique

Les bactéries susceptibles d'être rencontrées en bactériologie clinique sont en nombre relativement restreint en regard de la grande complexité du monde bactérien. Le diagnostic est très souvent orienté par la nature de l'infection et le type de prélèvement. Le plus souvent, le bactériologiste aura un choix à faire parmi les bactéries présentes à l'isolement et il n'identifiera avec précision que celles qui peuvent jouer un rôle dans le processus infectieux. L'espèce et parfois le sérotype sont presque toujours suffisants. Par contre, les méthodes de diagnostic choisies devront être rapides et permettre de donner un diagnostic présomptif approché quelques heures après le prélèvement, un diagnostic définitif et un antibiogramme 24 à 48 heures plus tard (Fauchere, 1997).

La démarche diagnostique se fait généralement en 3 étapes : diagnostic d'orientation, diagnostic d'espèce, détermination de marqueurs épidémiologiques ou utiles au traitement (sérotype, biovar, antibiotype...) (Fauchere, 1997).

8-1- Le diagnostic d'orientation

Il commence par l'examen direct qui va guider le choix d'une méthode d'isolement. L'une des étapes les plus importantes est le repérage des divers types coloniaux sur les milieux d'isolement. A ce point, il faudra souvent faire un choix des souches dont on va poursuivre l'étude. Cette étape fait appel à l'expérience et à la compétence du bactériologiste qui tient compte de données cliniques et épidémiologiques autant que de critères purement bactériologiques (Fauchere, 1997).

Chacune des souches retenues devra être classée dans un groupe taxonomique, généralement le genre ou la famille. Pour cette importante étape, on fait appel à des marqueurs fiables et de préférence rapides à obtenir, (morphologie, Gram, métabolisme énergétique, mobilité, oxydase, catalase, etc.). L'appartenance à un genre ou une famille sera ultérieurement confirmée par les caractères définissant le groupe taxonomique considéré (Fauchere, 1997).

8-2- Le diagnostic d'espèce

Il est réalisé grâce à un plus grand nombre de tests diagnostiques. Ces tests sont bien standardisés, de nombreux schémas d'identification existent pour les interpréter et des (Kits) diagnostiques performants sont en vente dans le commerce (API système par exemple). Pour ces raisons, cette deuxième étape n'offre en générale que peu de difficultés si toutefois, le groupe bactérien dans lequel le diagnostic a été orienté et utilisé d'emblée une galerie pour entérobactéries sur un germe qui peut être une *Neisseria* peut aboutir à une impasse ou à une erreur diagnostique (Fauchere, 1997).

Les méthodes numériques d'identification ont permis l'informatisation de cette étape. Les nombreux caractères connus de tous les groupes bactériens sont stockés dans des bases de données qui contiennent, pour chaque taxon, les fréquences de réponses positives et négatives aux différents marqueurs. Les caractères sont alors déterminés pour la souche inconnue et l'ensemble des résultats sert à établir le phénotype de la souche sous forme numérisée. Ce phénotype est comparé au phénotype théorique des différents taxons et le système calcule, pour les taxons les plus proches, des pourcentages d'identification relative qui expriment la qualité de l'identification (exemple : $\geq 99\%$ = excellente identification ; $\geq 90\%$ = bonne identification etc.) (Fauchere, 1997).

8-3-Détermination de marqueurs épidémiologiques ou utiles au traitement

Elle consiste à rechercher des marqueurs pouvant influencer le traitement (antibiotype), ou des marqueurs qui permettent une compréhension du rôle pathogène de la souche (recherche d'une toxine) ou qui constituent des marqueurs épidémiologiques (sérotypie, lysotypie, marqueurs épidémiologiques moléculaires) (Fauchere, 1997).

8-4-Méthodes rapides d'identification

La recherche des antigènes solubles dans les prélèvements s'est avérée décevante. La mise en évidence de métabolites ou de constituants bactériens dans les prélèvements ne s'applique qu'à certains cas limités. Les méthodes moléculaires permettant la mise en évidence, dans le prélèvement, de fractions du génome sont très développées en virologie, mais en encore peu d'application réellement performantes en bactériologie. L'amplification par PCR de gènes spécifiques suivie de l'identification des amplifiants par hybridation est actuellement la méthode qui suscite le plus d'espoir (Fauchere, 1997).

Conclusion

Produced with ScantOPDF

Conclusion

La taxonomie a pour but de regrouper les individus qui se ressemblent en groupes taxonomiques ou taxons, sur la base de leurs propriétés (marqueurs taxonomiques). La classification décrit les taxons et les rapports qu'ils existent entre eux, l'identification consiste à rechercher les marqueurs qui permettront de placer un individu dans un taxon et la nomenclature réunit les règles permettant de nommer un individu identifié.

Identifier, classer et nommer une bactérie, c'est en même temps résumer ses propriétés et transmettre de façon concise et précise, un grand nombre d'information. En bactériologie, une identification précise permet de prévoir le pouvoir pathogène, l'écologie et la sensibilité aux antibiotiques de la souche. La taxonomie permet à l'ensemble des microbiologistes de parler le même langage et d'être mieux compris par les autres disciplines.

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 est utilisé pour désigner des taxa à tous les niveaux.

Nos connaissances et les outils taxonomiques dont nous disposons évoluent ; le monde bactérien lui aussi évolue. Il est donc normal que la nomenclature et la classification bactériennes évoluent en parallèle. C'est pour quoi, régulièrement, des groupes bactériens changent de place dans la classification ou sont éclatés en groupes nouveaux. Leur nom est alors modifié pour refléter ces changements.

Les méthodes de la taxonomie numériques sont maintenant largement utilisées surtout grâce à l'outil informatique. Pour réunir les souches dans des groupes taxonomiques (espèce, genre...) on détermine un grand nombre des marqueurs.

Il y a plusieurs d'intérêts pour classer les microorganismes, Pour distinguer les uns des autres, afin d'aider ultérieurement à identifier des souches inconnues et pour identifier un nouvel isolement et donné un accès à la phylogénie. La taxonomie des microorganismes permet de mettre de l'ordre dans l'énorme quantité de connaissances que nous avons des organismes et permet de faire des prédictions et des hypothèses pour une recherche future, basés sur la connaissance d'organisme similaires, et répartit les micro-organismes en groupes significatifs utiles, avec des noms précis de sorte que les microbiologistes peuvent les étudier

et communiquer efficacement, essentiellement pour l'identification précise des micro-organismes.

Produced with ScanTOPDF

Références Bibliographiques

Produced with ScanTOPDF

Références bibliographiques

- Benguedouar A ., 2000.-** contribution à l'étude de la symbiose Rhizobium-Hedysarum coronarium : essai de caractérisation de l'espèce Rhizobium « hedysari ». Thèse de doctorat de université Mentouri de constantine . Algère.
- Berche P., 2002-2003.-** Bactériologie générale .P.C.E.M 2 .
- Busse H .J ., 1996. -** Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem .Averview of methods used in bacterials systematic. Journal of Biotechnology 47 : 3-38.
- Brenner., 1969.-** Technique à l'hybridation.
- Cuq J .L ., 2007.-** Microbiologie alimentaire.
- Darfu P ., TassyP., 1993.-** Reconstruction phylogénétique .Concepts et méthodes. Masson.
- Deley C ., Reynaerts ., 1970.-**Technique optique.
- Deley ., Tijtgat ., 1970.-** Hybridation sur filtre de nitrocellulose
- Fauchere J .L ., 1997 .-** bactério fiches .Professeur de bactériologie –virologie à la faculté de médecine et de pharmacie de poitiers . édition marking S .A .ISBN 2 – 7398 –4722-7 . édition marking S .A .
- Favet ., 2013.-**Séminaire de Bactériologie 4.
- Frédric Z ., 2004.-** diversité des bactéries Hote de legumineuse ; mediterrancene enTunisie Auliban.
- Geraldine P, Delphine., 2003.-** Raynaud des bactériologie- virologie.
- Gérard CH ., 2011 -2012.-** infection hygiene ; Bactériologie générale.
- Gèneromonont J ., 1996.-**dendogramme horologe moléculaire de l'évaluation dictionnaire du darwinisme et de l'évaluation paris .
- Lelliotttra R.A., Dickey R.S., 1984.-** Manual of systematic Bacteriology. Genus VII .Erwinia Winslow, Broadhurst, Buchanan,Krumweide, Pages 469 – 476. In Noel R. (eds).Volum 1.
- Larpent J.P ., 2000.-** Introduction à la nouvelle classification bactérienne .Technique & documentation, 11 rue lavoisier , paris cedex 08. ISBN : 2-7430-0417-7.
- Marchandine H ., 2007.-**physiologie bactérienne. Faculté de médecine Montpellier –Nîmes ; MB7 Bactériologie.

Olsen C.R., Woese C.R., 1993. - Ribosomal RNA: A key to Phylogeny .The FASEB journal. 7:113-123.

O'Brien M., Collewel R., 1987. - Characterization tests for numerical taxonomic studies. Method Microbial. 19: 69-104.

Ridley A., Saundres N.A., 1993. - Restriction Fragment Length Polymorphism analysis for epidemiological typing of *Listeria monocytogenes*. In New Technique in Food and Beverage Microbiology, Black well Scientific Publication. PP. 231- 249.

Singleton P., 2004.- Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies . 6^e édition .ISBN 2100488732.

Singleton .P., 2002.- bactériologie,4^eédition .http ://www .dunod.com, ISBN 210004273 4.

Tifrit A., 2010. - Introduction à la systématique bactérienne .http://www .bio-courses .Jimdo.com. 25/11/2010.

Tiouit D., 2011-2012 .- physiologie bactérienne.

Torche A., 2006 .- Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuse du genre *Hedysarum*. Mémoire de Magister . université Mentouri constantine. Algérie.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J.,1996.- Polyphasic taxonomy, a consensus Approach to Bacterial Systematics. Microbiological .Rev. 60 (2) :407 - 438.

Zvelebil M., Baum J., 2001.- understanding bionformatics.Monday , avril 25.

Sites internet:

1. (<http://www.microbes-edu..2002>)
2. (<http://www.phage.ulval.ca/>)
3. (www.medatrice-grenoble.fr)