

Chapitre III

La classification bactérienne

1- Introduction

Pour permettre la communication entre les différents acteurs de la surveillance épidémiologique, il est important de disposer de systèmes précis de classification et de nommage des souches bactériennes circulantes, ainsi que de leurs variants potentiellement pathogènes.

2- Définition de taxonomie (taxinomie)

C'est la science des règles de la classification. Du grec « **taxis** », qui veut dire ordre et « **nomie** » qui signifie lois. La taxinomie permet de nommer les organismes vivants (la nomenclature) et de les classer en unités (**taxons**), au sein desquels, ils partagent un grand nombre de caractéristiques communes.

« La taxonomie bactérienne a pour but d'établir des groupes de bactéries présentant des caractères communs, les **taxons**, auxquels elle va attribuer un nom ».

La taxonomie peut être décomposée en trois opérations complémentaires et interdépendantes : la **classification**, l'**identification** et la **nomenclature**.

2.1. La classification

Elle consiste à répartir les organismes en groupes taxonomiques (taxons) en fonction de leurs relations phénotypiques et/ou phylogénétiques. Actuellement, on distingue deux types de phénotypes :

- Le phénotype exprimé correspond à l'ensemble des caractères qui sont directement observables, tels que les caractères morphologiques, la coloration, les conditions de croissance, les caractères biochimiques, physiologiques, antigéniques, de sensibilité aux bactériophages ou aux substances antibactériennes, etc.

- Le phénotype cryptique, quant à lui, peut être analysé grâce à la chimiotaxonomie en étudiant la structure des molécules informationnelles.

2.2. L'identification

Elle consiste à attribuer des souches inconnues à l'un des taxons décrits, permettant ainsi de les classer de manière précise.

2.3. La nomenclature

C'est la discipline qui établit les règles d'un langage international permettant de désigner par un même nom, des bactéries identiques dans n'importe quelle région du monde. Elle englobe l'ensemble des règles qui régissent l'attribution d'un **nom** à chaque taxon distinct.

L'usage d'une nomenclature correcte permet de désigner un taxon sans être obligé de décrire tous ses caractères, et à tous les spécialistes (épidémiologistes, chercheurs, cliniciens, fabricants de vaccins, etc.) de se comprendre sans ambiguïté. Par exemple, le simple fait de rapporter une souche bactérienne à la famille des *Enterobacteriaceae* indiquera à tout bactériologiste que cette souche réunit des bactéries à Gram négatif, en majorité non sporulées, aéro-anaérobies, etc....

❖ On distingue deux catégories de noms :

- Les **noms informels (vernaculaires)** utilisés dans chaque langue nationale, comme **collibacile** pour désigner *Escherichia coli*. Certains noms conservent une valeur historique (« bacille de Koch » pour *Mycobacterium tuberculosis*), d'autres sont source de confusions (ex : le « vibrion septique » évoque le genre *Vibrio*, alors qu'il appartient aux *Clostridium*)

- Les **noms scientifiques (mots latins)** : Les règles de nomenclature scientifique sont celles édictées par le botaniste suédois Carl Von Linné en 1753. Comme dans les autres disciplines des sciences du vivant (botanique, zoologie...), la nomenclature des bactéries est **binomiale** : La première partie du nom est le nom du **Genre**, la seconde partie est celui de **l'espèce**.

Exemple : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*.

Cette nomenclature est **universelle** et réglementée par le Code International de la Nomenclature Bactérienne.

✚ Règles de formation des noms scientifiques (hiérarchie taxinomique)

En bactériologie, il est indispensable que l'ensemble des spécialistes concernés utilisent une nomenclature commune pour pouvoir collaborer efficacement.

- Les échelons hiérarchiques les plus utilisés en bactériologie médicale sont : Ordre, famille, genre et espèce.

- Ces taxons sont exprimés par des mots **latins** (imprimé en caractères *italiques* ou soulignés) dont la terminaison est

- ✓ "ales" pour l'ordre,
- ✓ "**aceae**" pour la famille,
- ✓ "us", "er" (masculin) ou "a" (féminin) pour le genre et l'espèce qui sont accordés grammaticalement.

- En pratique courante, le **genre** et **l'espèce** suffisent pour caractériser une souche (système binomial).

- Le **genre** : écrit en *Italique*. Avec sa première lettre en **majuscule**.

- **L'espèce** : une « épithète » écrite en *Italique* (ou souligné). Avec sa première lettre en minuscule.

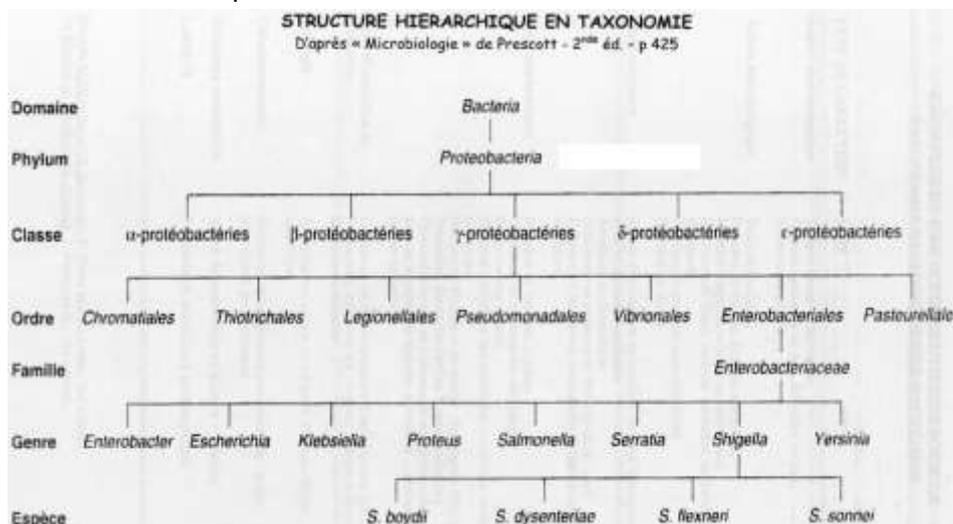
Exemple *Salmonella enterica* (Genre : *Salmonella*, espèce : *enterica*).

- Après une première citation, l'utilisation de la première lettre du nom de genre suivie d'un point puis de l'épithète est tolérée (exemple : *S. enterica*, *E. coli*).

- Les noms des **sous-espèces** sont formés d'une combinaison ternaire où le nom d'espèce est suivi par l'abréviation « subsp. » et d'un troisième terme propre à la sous-espèce écrit en italique. Exemple : *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*.

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

Exemples de structures hiérarchiques :



TAXON	Exemple 1	Exemple 2	Exemple 3
Domaine	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Listeriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Listeria</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Sérovar	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Vibrio cholerae</i> O1	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b

3. Principes et méthodes de la classification bactérienne

3.1. Classification phénétique (phénotypique)

C'est une approche utilisée pour classer les bactéries en fonction de leurs caractéristiques **observables** et **mesurables**. Elle comprend toutes les techniques ne faisant pas appel aux acides nucléiques et repose sur les similitudes phénotypiques (caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques).

3.1.1. Supports de la classification phénétique

De nombreuses manipulations au laboratoire mettent en évidence les différences phénotypiques entre les bactéries.

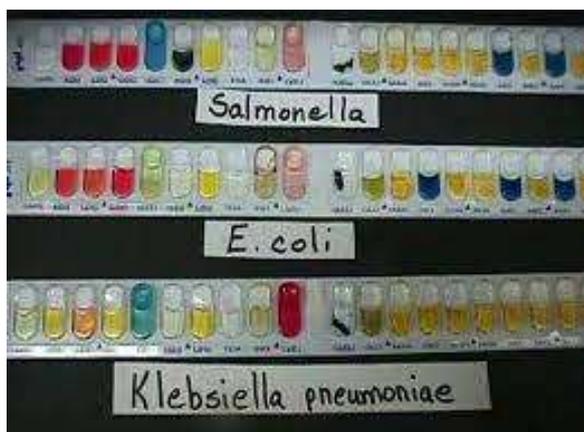
✚ Observations macroscopiques, microscopiques et caractères tinctoriaux

- Descriptions des colonies (forme, taille, couleur, odeur) ;
- Morphologie des **cellules** (bacille, coque) et leurs **arrangements**.
- Les **colorations** (Gram, bleu méthylène, acido-alcoolo-résistants).
- Observation de **la mobilité** à l'état frais.
- Présence ou absence des **endospores**,
- La croissance **aérobie** ou **anaérobie**.

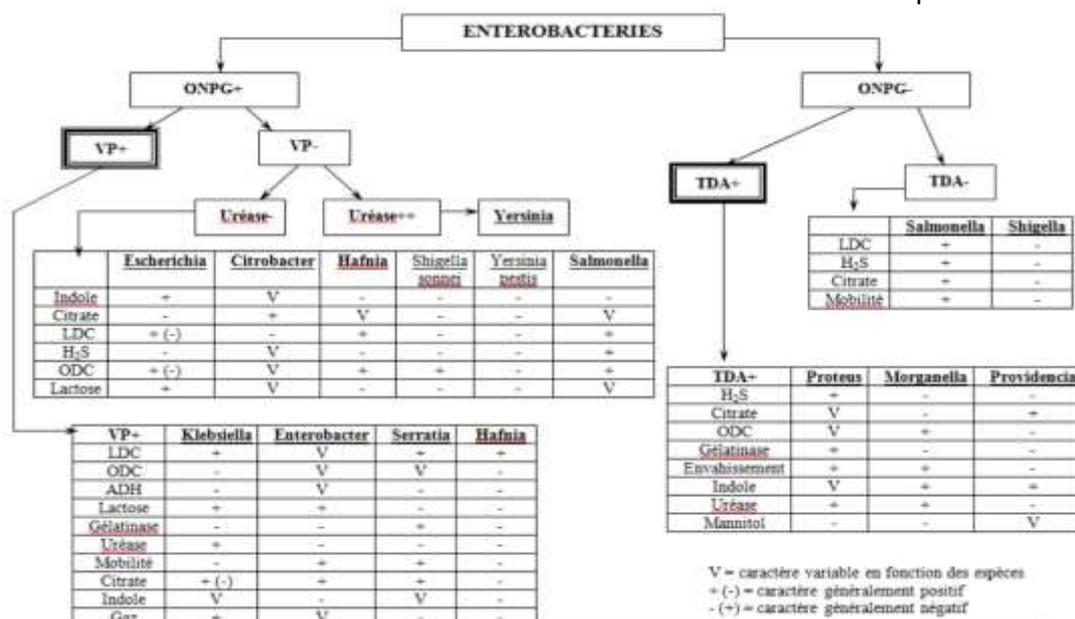
Les caractères morphologiques sont utiles pour l'identification, mais ne peuvent pas démontrer à eux seuls les relations phylogénétiques.

✚ Les tests métaboliques

Très importants, ils peuvent distinguer des bactéries très apparentées. On recherche la présence d'enzymes (oxydase, catalase), la dégradation de l'urée, de l'esculine. La transformation du lactose et la production de gaz, l'utilisation de différents sucres comme source de carbone, l'utilisation du citrate, la production d'acétone, etc. Ces techniques ont été miniaturisées dans des galeries spécialisées (API)



Exemple : classification des entérobactéries en fonction de caractères biochimiques



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

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

✚ **Chimiotaxonomie** : on détermine le profil des acides gras des parois. Le profil des protéines totales par électrophorèse.

Exemple :

▪ La composition du peptidoglycane peut être utilisée à des fins taxonomiques particulièrement pour les bactéries à Gram positif. Bien que la partie glucidique soit très conservée entre les différentes espèces, le peptidoglycane présente une grande variabilité structurale. La partie peptidique ainsi que le type et la composition du pont inter-peptidique varient considérablement.

▪ Chez les bactéries à Gram négatif, le type de peptidoglycane présente un intérêt taxonomique limité.

▪ Les acides teichoïques peuvent être utilisés en tant que marqueurs phénotypiques. Leur absence chez *Micrococcus* spp. permet de les distinguer des *Staphylococcus* spp. Au sein de ce genre, le type d'acide teichoïque permet de différencier *Staphylococcus aureus* des autres espèces de staphylocoques.

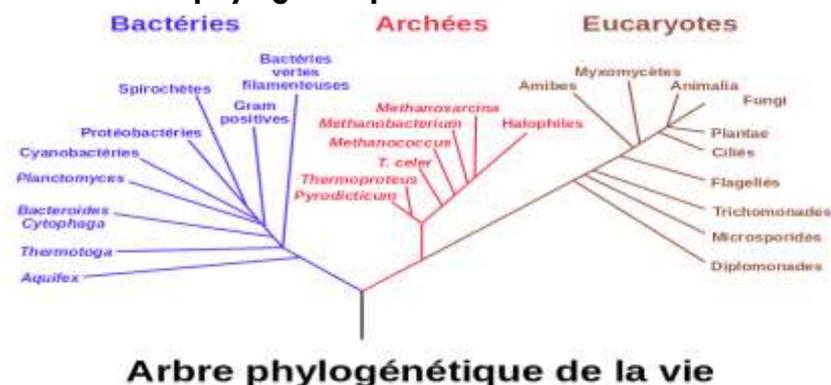
✚ **Lysotypie** : infection par des bactériophages et formation de plages de lyses. On définit le lysovar ou le lysotype.

Cette méthode de classification a ses limites, par exemple :

- La forme peut varier en fonction du milieu de culture et peut être parfois difficile à définir.
- Une activité enzymatique donnée peut ne pas être détectée lors de l'utilisation d'un substrat synthétique,
- Deux bactéries éloignées peuvent présenter des antigènes en commun...
- Les caractères phénotypiques utilisés sont peu nombreux (une centaine au maximum) par rapport au nombre de gènes habituellement présents chez les bactéries (5 000 environ).

3.2. Classification phylogénique (naturelle)

Du grec *Phylon* : race et *Genesis* : génération, elle se base sur l'existence d'espèces clairement identifiées et génétiquement homogènes qui, à partir d'un ancêtre commun, ont évolué différemment. Elles sont basées sur les liens de parenté et les divergences évolutives entre les différents taxons tels que les genres, les familles et les ordres. Cette approche permet de représenter les relations évolutives entre les différentes espèces dans un **arbre phylogénétique**.



Supports de la classification phylogénique

Ces méthodes sont basées sur l'analyse des molécules d'ADN ou d'ARN, soit au niveau de l'ensemble du génome, soit en ciblant certains fragments du chromosome bactérien.

✚ Composition de l'ADN

- Le GC% (ou coefficient de Chargaff)

Quel que soit l'espèce d'origine, l'ADN contient toujours autant de purine que de pyrimidine soit :

$$(A + G) = (C + T) \text{ ou } (A+G) / (C+T) = 1$$

De plus, il y a autant de thymine que d'adénine $A/T = 1$, autant de guanine que de cytosine $G/C = 1$

Par contre, le rapport $(A+T)/(C+G)$ varie beaucoup : il est **caractéristique** de l'espèce.

Ce coefficient appelé *Coefficient de Chargaff* peut être calculé suite à un séquençage par la formule suivante $G + C \% = (G + C) \times 100 / (A + T + G + C)$.

Le GC% varie selon les espèces, il est de 50% chez *E. coli*, 60% chez *Pseudomonas*, 25 à 45% chez *Clostridium*. Il est donc intéressant du point de vue taxonomique :

- deux bactéries appartenant à la même espèce possèdent des GC% identiques (à 2,5 % près) ;
- deux bactéries ayant des GC% différents n'appartiennent pas à la même communauté génétique ;
- deux bactéries qui ont un GC% identique ne présentent pas obligatoirement les mêmes séquences nucléotidiques, et peuvent donc être éloignées génétiquement.

Ainsi, le GC% ne peut être qu'un critère **d'exclusion** : il permet seulement d'affirmer que deux individus sont éloignés du point de vue génétique. Il permet, par exemple, d'affirmer que deux souches n'appartiennent pas au même genre. Exemple, le GC% de *Staphylococcus aureus* est d'environ 30 %, tandis qu'il est compris entre 62 et 70 % pour le genre *Micrococcus* !

Parmi le monde vivant, c'est au sein des bactéries que les valeurs les plus dispersées du coefficient G+C% sont retrouvées. En effet, alors que le contenu en G+C des animaux et des plantes supérieures varie entre 30 et 50%, il présente chez les procaryotes des valeurs allant de 23.7% chez *Mycoplasma sualvi* à 79% pour le genre *Pseudonocardia*.

- **La taille du génome bactérien**

La taille du génome correspond à la **quantité d'ADN** contenue dans une copie d'un génome. Elle est mesurée par le **nombre de nucléotides** (paires de bases) avec le Mégabase, notée Mb (1 million de nucléotides) comme unité.

Les différences de taille du génome peuvent être utilisées pour déterminer les degrés de parenté entre les bactéries et construire des arbres phylogénétiques. Les bactéries ayant des génomes de taille similaire peuvent être considérées comme étant plus étroitement liées évolutivement.

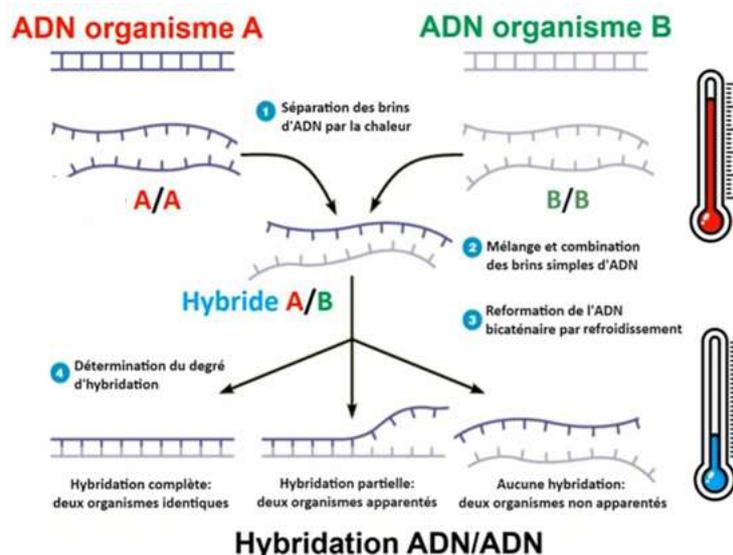
	Organisme	Taille du génome (Mpb)	Nombre de gènes protéiques estimés
Bactéries	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0,816	689
	<i>Pelagibacter ubique</i>	1,3	1 354
	<i>Haemophilus</i>	1,8	1 657
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,8	2 619
	<i>Bacillus subtilis</i>	4,2	4 106
	<i>Escherichia coli</i>	4,64	4 243

✚ **Détermination des taux d'hybridation ADN-ADN**

Cette technique, appelée **hybridation moléculaire** est basée sur l'idée que des espèces similaires ou **apparentées** ont des séquences de nucléotides semblables. Elle repose sur la **capacité** des brins d'ADN à **s'apparier** avec des brins complémentaires après avoir été **séparés** par la **chaleur** (rupture des liaisons hydrogène entre les bases).

En chauffant et en refroidissant lentement les brins d'ADN séparés provenant de deux organismes différents, on peut recomposer un ADN bicaténaire à partir de monobrans préalablement séparés d'ADN bactérien. Les monobrans homologues (complémentaires) peuvent provenir de la même souche : hybridation **homologue** (AxA') ou de souches différentes (souches A et B) : c'est l'hybridation hétérologue (AxB) et l'ADN formé est un ADN **hybride**.

L'hybridation permet de déterminer les relations de parenté génétique entre les organismes confrontés (AxB) par l'évaluation de leur **taux d'homologie**. Plus les organismes sont apparentés, plus l'hybridation sera forte. Cependant, l'hybridation ADN-ADN est généralement utilisée pour l'étude de microorganismes étroitement apparentés.

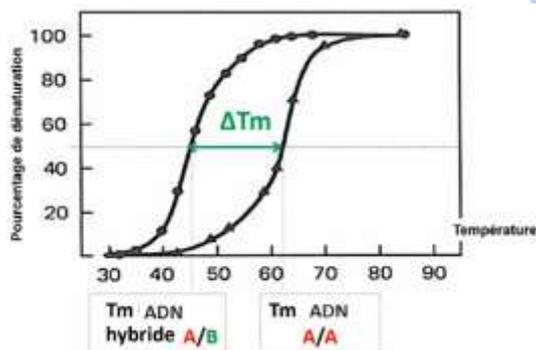


$$\text{Taux d'hybridation} = (\text{concentration d'ADN hybride} / \text{concentration totale d'ADN}) \times 100$$

On prend en considération également la **stabilité thermique des hybrides** qui est évaluée en mesurant la température de fusion (**T_m**) à laquelle les brins d'ADN provenant de différentes espèces se séparent.

Des T_m similaires indiquent une plus grande similarité génétique, tandis que des T_m différentes suggèrent une divergence génétique plus importante.

Ainsi, on considère que :



Deux bactéries A et B sont de la même espèce si : **taux d'hybridation ADN/ADN ≥ 70%** et **ΔT_m ≤ 5°C**

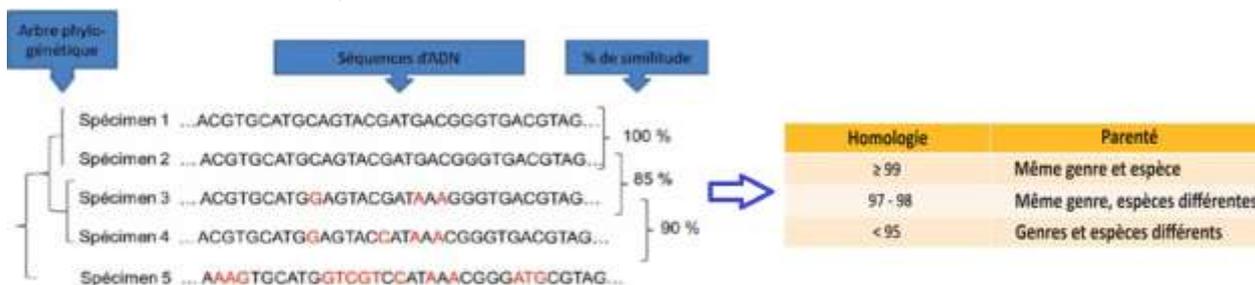
✚ Etude des ARN ribosomiaux (ARNr)

Les ARNr sont considérés comme des « chronomètres moléculaires » :

- ils sont présents dans les cellules procaryotes et eucaryotes,
- ils ont une structure bien conservée chez tous les êtres-vivants,
- Ils sont abondants dans la cellule, faciles à purifier et à séquencer

Le plus utilisé pour les études taxonomiques est l'ARNr 16S qui est utilisé comme marqueur moléculaire en raison de sa conservation évolutive. Les travaux sur ces ARNr 16S ont permis de distinguer les Eubactéries des Archéobactéries.

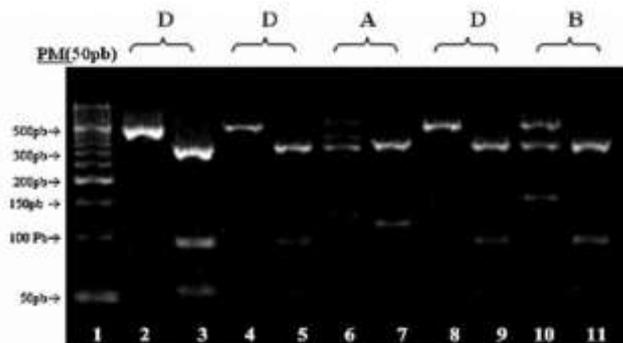
Le **séquençage** de l'ADN codant pour l'ARNr 16S est une étape clé dans l'utilisation de l'ARNr 16S pour la taxonomie bactérienne. Il permet de construire des arbres phylogénétiques et de déterminer les liens évolutifs et les relations phylogénétiques entre différentes espèces bactériennes.



Séquençage des gènes ADNr 16S

✚ Etude des profils de restriction

L'ADN double brin peut être coupé par des enzymes de restriction, dénommées **endonucléases**. Le génome bactérien est alors caractérisé par une série de **fragments** (dont la taille est mesurable) séparés par électrophorèse en gel d'agarose. Le mode d'action très spécifique des endonucléases permet d'établir des profils de restriction, d'où leur intérêt en taxonomie



3.3. Classification de Bergey

La classification bactérienne de référence la plus utilisée parmi les microbiologistes actuellement est la classification de **Bergey's Manual**. C'est un guide pour distinguer les espèces bactériennes en fonction des différences entre chaque souche de bactérie, à partir de la souche type. Publié pour la première fois par David Hendricks Bergey en 1923 et est continuellement enrichi et mis à jour depuis cette époque.

Ce manuel divisé en 5 volumes avait pour objectif initial le regroupement des informations phénotypiques disponibles sur les espèces bactériennes reconnues, afin de permettre l'identification de souches inconnues. Il a classé les bactéries connues en tribus, familles et ordres en fonction de plusieurs paramètres, notamment structurels, et attributs fonctionnels. Cependant, ce processus est devenu très empirique et a été remplacé par l'analyse des données phylogénétiques.

Ce document est une classification du règne des procaryote. Il les divise en deux domaines : Les bactéries (*Bacteria*) et les Archéobactéries (*Archaea*) et chaque domaine est divisé en embranchements, chaque embranchement en classe, les classes en ordres, les ordres en familles, les familles en genres et les genres en espèces.

Tableau : Division des procaryotes.

Domaines	2	<i>Archaea</i>	<i>Bacteria</i>
Phylums	34	5	29
Classes	57	9	48
Sous-Classes	6	0	6
Ordres	119	15	104
Sous-ordres	20	0	20
Familles	292	26	266
Genres	2100 environ	108	2000 environ
Espèces	7 300 environ	250 environ	7 000 environ
Sous-espèces	450 environ	0	450 environ

Pour rester au fait de cette explosion des connaissances sur le monde microbien, un manuel électronique avec des mises à jour fréquentes est nécessaire. Le *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (BMSAB)* est un outil essentiel pour toute personne à la pointe de la recherche en microbiologie. L'édition numérique fournit des descriptions à jour de la taxonomie, de la systématique, de l'écologie, de la physiologie et d'autres propriétés biologiques de tous les taxons procaryotes nommés.

Unité taxonomique de base : la notion d'espèce bactérienne

L'**espèce (species)** représente le taxon de base (unité de base de classification) chez les espèces sexuées. L'espèce se définit alors comme une communauté d'êtres vivants naturellement interféconds pouvant normalement échanger du matériel génétique par la reproduction sexuée qui conduit à des descendants eux-mêmes normalement **féconds**.

Cette définition n'est évidemment pas applicable aux procaryotes. Les bactériologistes ont dû élaborer une définition originale de l'espèce :

"En bactériologie, une espèce est constituée par sa **souche type** et par l'ensemble des souches considérées comme suffisamment proches de la souche type pour être incluses au sein de la même espèce."

Néanmoins, des lignées phylogénétiques distinctes au sein de la même espèce microbienne peuvent posséder des propriétés très différentes en termes d'écologie ou de pathogénicité. Exemple : l'espèce *Escherichia coli* comprend des souches commensales ainsi que des souches très pathogènes comme les *E.coli* entérohémorragiques (EHEC).

Par conséquent, différents systèmes ont ainsi été utilisés pour distinguer les souches comme :

- ✓ Biovars: souches différentes biochimiquement ou physiologiquement
- ✓ Sérovars (sérotypes) : souches à propriétés antigéniques distinctives ;
- ✓ Pathovars: souches à pathogénicités différentes;

- ✓ Zymovars: souches différentes en isotypie des enzymes
- ✓ Lysovars (lysotype ou phagovar, phagotype) : souches différentes niveau sensibilité à des bactériophages ;
- ✓ Antibiotypes: souches différentes niveau sensibilité aux antibiotiques.

❖ **Taxonomie numérique**

Appelée également classification **adansonienne** (du botaniste français Adanson), elle tient compte de l'ensemble des caractères d'un organisme, chaque caractère ayant la même « valeur ».

Principe: Le but recherché est de rassembler dans une classe de similitude les individus les plus semblables. La méthode consiste à :

- Etudier, pour chaque souche, un nombre (50 – 100) de caractères morphologiques, biochimiques, culturels, structuraux...
- Attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés +/1 (présence du caractère) ou -/0 (absence du caractère).
- L'affinité entre les souches de bactéries est mesurée à l'aide de l'indice de similitude **Jaccard**.

$$\text{Indice de Jaccard : } S_{(A,B)} = \frac{nS^+}{nS^+ + nd}$$

- **S_(A,B)** : Coefficient de similitude entre deux souches A et B.
- **nS⁺** : Nombre de caractères positifs semblables entre A et B.
- **nd** : Nombre de caractères différents.

On considère que deux souches A et B appartiennent à la même espèce si $S_{(A,B)} \geq 0,85$ (85%).

Exemple :

$$S_{AB} = \frac{nS_{AB}}{nS_{AB} + nD}$$

$$S_{AB} = \frac{2}{2+5} = 28,57\%$$

	Souche A	Souche B	Souche C	Souche D	Souche E
Caractère 1	+	-	+	+	-
Caractère 2	+	+	-	+	+
Caractère 3	ND	-	+	ND	+
Caractère 4	+	-	+	+	+
Caractère 5	-	+	ND	+	+
Caractère 6	+	ND	+	+	+
Caractère 7	+	+	+	ND	+
Caractère 8	-	-	-	+	+
Caractère 9	-	+	-	+	+
Caractère 10	-	+	-	+	+
Caractère 11	-	-	-	+	+

Similitude

Différence