



La **systématique** a pour but de classer les êtres vivants de manière rationnelle en se basant sur les ressemblances et sur les relations qui existent entre eux. Elle repose sur deux disciplines, la **nomenclature** et la **taxonomie** (ou taxinomie) :

- la **taxonomie** est la science qui permet de **classer les organismes en taxons** ;
- la **nomenclature** est l'ensemble des **règles utilisées pour donner un nom à chaque taxon** .

1. Principales règles de nomenclature

- La nomenclature bactérienne utilise des mots latins ou latinisés qui sont traditionnellement écrits en italique ou ils sont soulignés dans un manuscrit.
- Aucun signe diacritique (á, à, â, ä, ã, é, è, ê, ë, í, î, ï, ñ, ó, ò, ô, ö, õ, ú, ù, û, ü, ø, æ...) n'est toléré et les mots ne doivent pas contenir de trait d'union. Par exemple, on doit écrire *Bacteroides* et non *Bacteroïdes*.
- Les noms de famille et de genre s'écrivent avec une majuscule.
- Les noms des espèces sont formés d'une combinaison binaire dont le premier terme est le nom de genre et d'un deuxième terme (« une épithète »). Le premier terme prend une majuscule et le deuxième terme commence par une minuscule (exemple : *Streptococcus equi*). 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. equi*).
- Les noms des sous-espèces sont formés d'une combinaison ternaire commençant par le nom d'espèce suivi par l'abréviation « subsp. » et d'un troisième terme propre à la sous-espèce (exemple : *Streptococcus equi* subsp. *equi*).

Les principaux échelons hiérarchiques sont les suivants :

TAXON	Exemple 1	Exemple 3	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

2. Principes et méthodes de la taxonomie bactérienne

2.1. Supports de la classification phénotypique

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

- aspect macroscopique des colonies ;
- morphologie et structure de la cellule (forme, Gram, flagelle, capsule, spore...) ;
- conditions de culture (type trophique, type respiratoire, température optimale, pH optimal, concentration en dioxygène, exigences nutritionnelles particulières...) ;
- caractères biochimiques (ONPG, mannitol, indole, TDA...) ;
- Sérotypie (antigènes O et H des entérobactéries, antigènes des streptocoques...) ;
- Lysotypie (sensibilité aux phages) ;
- Antibiotypie (sensibilité aux antibiotiques).

Ainsi, le placement d'une souche bactérienne dans la famille des *Enterobacteriaceae* nécessite que cette souche soit constituée de bacilles à Gram négatif, non sporulés, AAF, oxydase négative... Cette méthode de classement a ses limites : la forme peut varier en fonction du milieu de culture et peut être parfois difficile à définir (bacilles coccoïdes et coques cocco-bacillaires...), 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...

Dans cette classification, 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).

De plus, ces caractères sont hiérarchisés les uns par rapport aux d'autres. Par exemple, le résultat de la coloration de Gram est considéré comme beaucoup plus significatif que l'utilisation du sorbitol. Une telle conception facilite l'identification bactérienne, mais elle est néanmoins subjective (car elle attribue une « valeur » différente aux caractères utilisés).

2.2. Supports de la classification génotypique

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis de comparer les bactéries entre elles d'une manière plus rigoureuse. La classification est obtenue par la comparaison molécules d'ADN des bactéries.

2.2.1. Le GC% (ou coefficient de Chargaff)

Chaque base azotée est présente dans une certaine concentration molaire dans une molécule d'ADN donnée. Cette molécule d'ADN peut être caractérisée par le rapport molaire des bases :

$$\text{GC\%} = \frac{[\text{G}] + [\text{C}]}{[\text{G}] + [\text{C}] + [\text{A}] + [\text{T}]} \times 100$$

Ce rapport est mesurable grâce à une caractéristique particulière de l'ADN bicaténaire, l'**hypochromicité**. En effet, l'ADN double-brin absorbe faiblement à **260 nm**, car les bases se font face dans la double hélice. La rupture des **liaisons hydrogènes** entre les bases, par action d'un **agent dénaturant** (la chaleur par exemple), entraîne la séparation des deux brins (**dénaturation**) et une **forte augmentation de l'absorbance à 260 nm**, appelée **effet hyperchromique**. Lorsque l'agent dénaturant est la chaleur, la température permettant d'obtenir une augmentation de l'absorbance de 50 % par rapport à l'absorbance maximale est appelée **température de transition Tm** (pour *temperature melting*). **Cette température est d'autant plus élevée que le nombre de paires GC est élevé**, car il y a trois liaisons hydrogènes entre G et C, contre deux entre A et T (les forces de cohésion des deux brins sont donc d'autant plus importantes que les paires GC sont fréquentes).

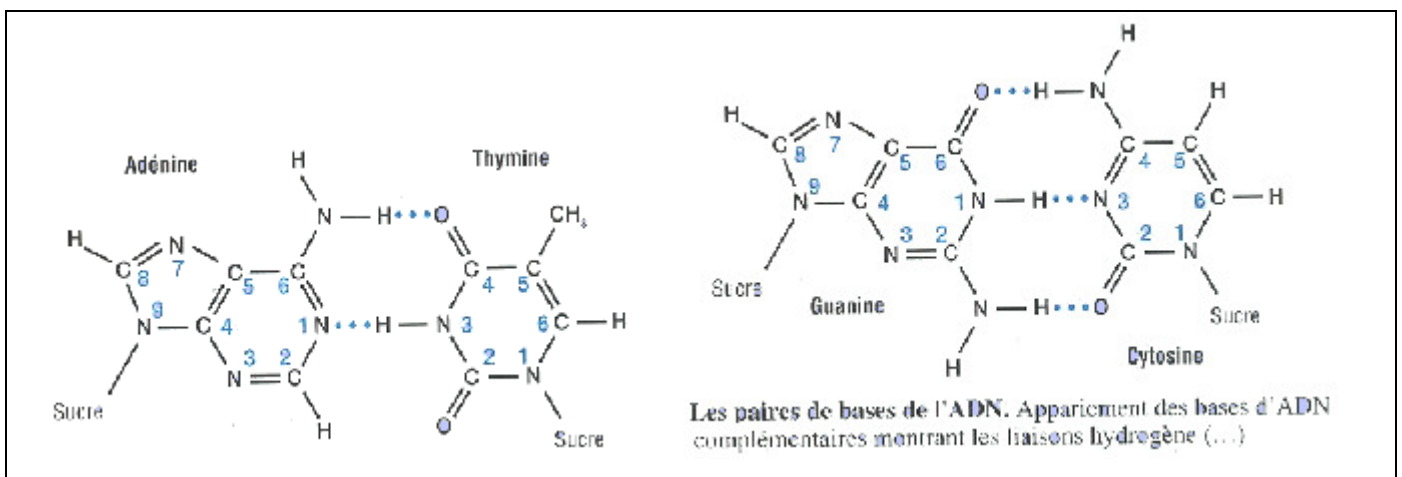


Figure 1

Le **GC%** **varie selon les espèces**, 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.

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. Ainsi, l'espèce *Proteus morganii*, dont le **GC%** est égal à 50 %, est devenue *Morganella morganii*, car les autres bactéries du genre *Proteus* ont un **GC%** compris entre 38 et 42 %. Autre exemple, le **GC%** de *Staphylococcus aureus* est d'environ 30 %, tandis qu'il est compris entre 62 et 70 % pour le genre *Micrococcus* ! Il est donc inconcevable que les staphylocoques appartiennent à la famille *Micrococcaceae*...

Espèce	taille du génome (pb)	taux de [G+C]	fraction codante
<i>Bacillus subtilis</i>	4.214.810	43,5%	97%
<i>Borrelia burgdorferi</i>	910.725	29%	93%
<i>Campylobacter jejuni</i>	1.641.481	31%	94%
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1.042.519	41%	nd
<i>Escherichia coli</i>	4.639.221	51%	88%
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2.174.500	27%	90%
<i>Haemophilus influenzae</i>	1.830.127	38%	87%
<i>Helicobacter pylori</i>	1.667.867	39%	91%
<i>Lactococcus lactis</i>	2.365.589	35%	87%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4.411.529	66%	91%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	816.394	40%	89%
<i>Neisseria meningitidis</i>	2.272.351	51,5%	83%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.264.403	67%	89%
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1.111.523	29%	76%
<i>Shigella flexneri</i>	4.607.203	51%	80%
<i>Streptomyces coelicolor</i>	8.667.507	72%	89%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2.160.837	40%	nd
<i>Treponema pallidum</i>	1.138.006	53%	93%
<i>Vibrio cholerae</i>	4.033.460	47,5%	88%
<i>Xanthomonas campestris</i>	5.076.187	65%	84%
<i>Yersinia pestis</i>	4.653.728	48%	84%

Tableau des génomes procaryotes totalement séquencés.

2.2.2. Hybridation ADN / ADN

Cette méthode permet la comparaison de la totalité du génome de deux bactéries par la mesure du **degré d'homologie** des deux ADN. Les différentes techniques reposent sur le même principe : la **renaturation in vitro** de deux brins d'ADN **hétérologues** (chaque brin provenant de deux bactéries comparées) conduit à la formation d'un **hétéroduplex**. Le degré d'homologie est le pourcentage de séquences complémentaires par rapport aux séquences totales. Ces techniques d'hybridation ont bouleversé la classification bactérienne.

L'ADN chromosomique de chaque souche est extrait, purifié et fragmenté avant d'être dénaturé puis renaturé en présence d'ADN marqué. La technique la plus utilisée est le marquage radioactif : le « marqueur » permet de repérer les hybrides formés entre l'ADN de la souche **cible** (C) et celui de la souche de **référence** (R) :

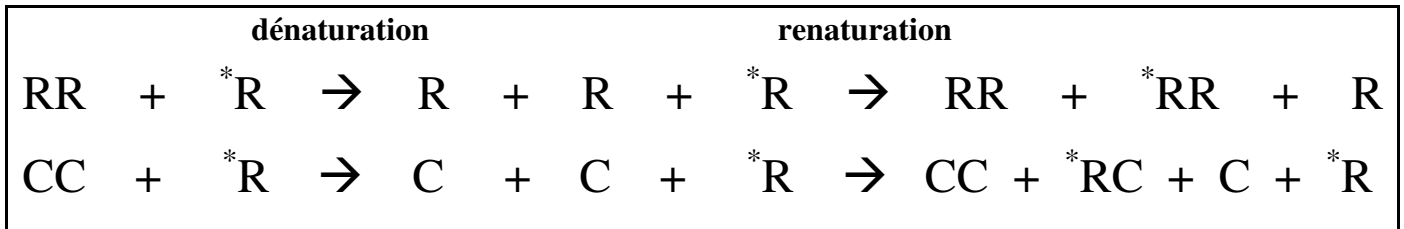


Figure 2

Le marquage spécifique (exprimé en quantité de radioactivité) des duplex homologues (*RR) et hétérologues (*RC) est mesuré puis le rapport [*RR] / [*RC] est déterminé. Cette méthode d'hybridation peut être réalisée sur filtre de nitrocellulose ou dans une colonne d'hydroxyapatite.

On considère que deux souches appartiennent à la même espèce si le taux d'hybridation entre les deux ADN est supérieur ou égal à 70 %. On prend également en compte la stabilité thermique des hybrides. Ces études permettent de définir des « genomospecies », c'est à dire des espèces génomiques.

Par exemple, en 1980, Brenner *et al.* ont réalisé des études d'homologie ADN - ADN sur 175 souches de *Yersinia enterocolitica*. Leurs résultats ont permis d'identifier quatre genomospecies : *Yersinia enterocolitica sensu stricto*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenii* et *Yersinia frederiksenii*. Au contraire, Les *Shigella* sp. et les souches de *Escherichia coli* appartiennent à une même genomospecies.

2.2.3. Etude des ARN ribosomaux (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,
- des portions d'ARNr ont une séquence identique chez tous les êtres vivants.
- Ils sont abondants dans la cellule, faciles à purifier et à séquencer (utilisation d'une reverse transcriptase).

Les ARNr s'associent à des protéines pour former les ribosomes. La sous-unité 30S d'un ribosome contient de l'ARNr 16S et la sous-unité 50S contient de l'ARNr 5S et de l'ARNr 23S. L'ARNr 5S est formé d'environ 120 nucléotides, l'ARNr 16S de 1 500 nucléotides et l'ARNr 23S comprend environ 2900 nucléotides. Le plus utilisé pour les études taxonomiques est l'**ARNr 16S**.

Les travaux sur ces ARNr 16S ont permis de distinguer les Eubactéries (« bactéries vraies ») des Archéobactéries (ou Archéobacteries).

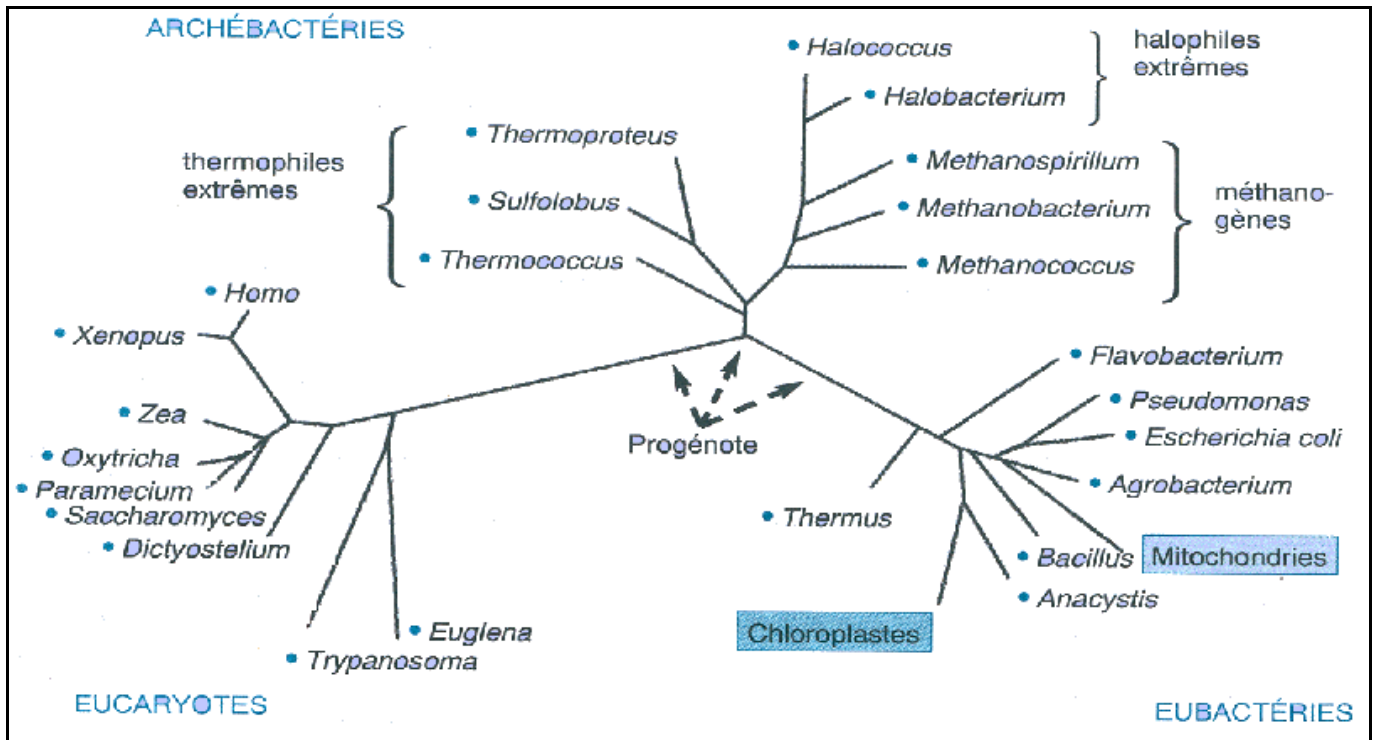


Figure 3 : Arbre phylogénétique universel du vivant
 Cette représentation simplifiée a été établie à partir de l'étude comparative des ARNr 16S et 18S.
 Source : Jean-Claude CALLEN, *Biologie Cellulaire*, Dunod, 1999

2.2.4. 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 et en épidémiologie.

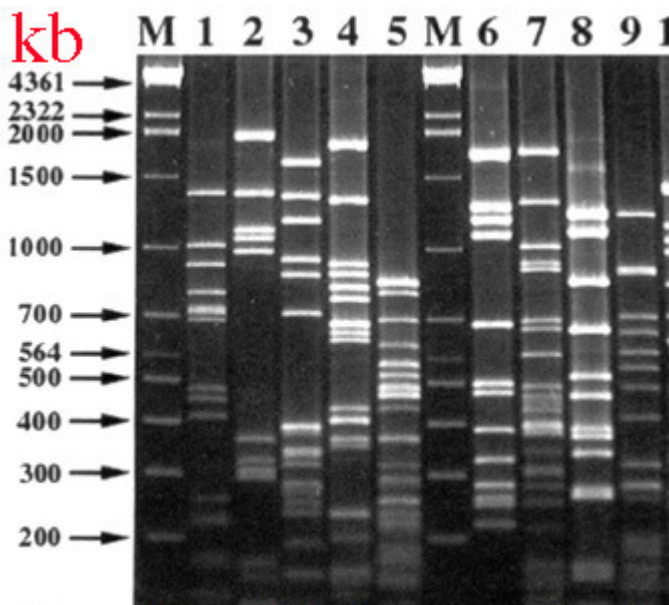


Figure 4 : Exemples de profils de restriction

2.3. Taxonomie numérique

En 1763, le botaniste français Adanson proposait une méthode de classification qui tenait compte de l'ensemble des caractères d'un organisme, chaque caractère ayant la même « valeur » (le même « poids »). En 1957, Sneath applique une méthode similaire aux bactéries et développe une taxonomie qualifiée de **numérique** ou d'**adansonienne**.

De manière schématique, la méthode consiste à étudier, pour chaque souche, plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, cultureux, structuraux... et à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0 (absence du caractère). Le but recherché est de rassembler dans une classe de similitude les individus les plus semblables.

L'analyse mathématique de quantités importantes de données concernant les caractères phénotypiques et moléculaires permet le calcul des distances existant entre différents groupes taxonomiques. Les résultats obtenus peuvent être représentés graphiquement sous forme de **dendrogramme**.

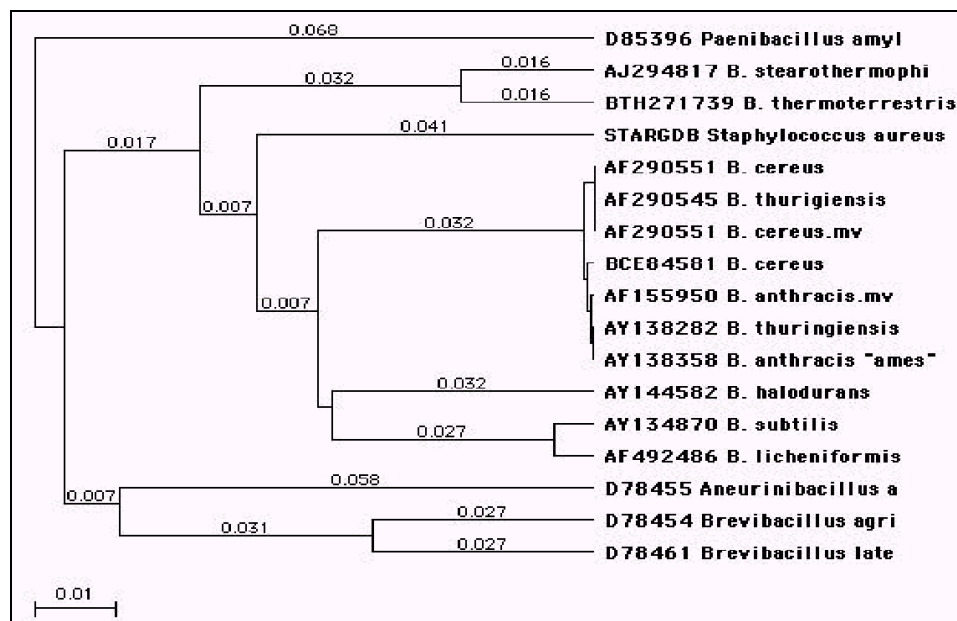


Figure 5 : dendrogramme, de quelques espèces du genre *Bacillus* et de genres apparentés.

3. Identification probabiliste

L'étude de nombreuses souches bactériennes a permis la constitution de bases de données associant à chaque espèce bactérienne, pour chaque caractère, un pourcentage représentant la probabilité de positivité :

	ON PG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
<i>Escherichia coli</i> 1	90	1	74	70	0	1	3	0	89	0	0	99	98	1	91	82	36	75	3	99	0
<i>Shigella sonnei</i>	96	0	0	93	0	0	0	0	0	0	0	99	99	0	1	75	1	1	0	99	0

L'identification d'un micro-organisme inconnu est alors obtenue par un calcul de probabilité portant sur l'ensemble des caractères testés. Le nom du taxon (espèce ou genre) le plus probable est fourni par un catalogue analytique ou un logiciel adapté.

API 20 E V4.0
[Instructions](#)
[Vérification des couleurs](#)
[Réinitialiser](#)

ONPG ADH LDC ODC CIT H₂S URE TDA IND VP GEL GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA OX

5 1 4 4 5 5 3

FAIBLE DISCRIMINATION	
Galerie	API 20 E V4.0
Profil	5 1 4 4 5 5 3
Note(s)	

Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
<i>Escherichia coli</i> 1	66.9	0.75	AMY	3%		
<i>Kluyvera</i> spp	32.6	0.67	LDC	25%	SOR 25%	SAC 89%

Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
<i>Citrobacter koseri/farmeri</i>	0.1	0.22	LDC	0%	SAC 99%	

Test(s) complémentaire(s)	CELac	ASCORB.ac	MDGac	ESC (HYD.)
<i>Escherichia coli</i>	2%	NT	0%	20%
<i>Kluyvera ascorbata</i>	100%	+	98%	98%
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	100%	-	94%	100%

Figure 6 : logiciel APIweb

4. Systématique des principaux groupes microbiens

BACTERIES GRAM NEGATIVES	BACTERIES GRAM POSITIVES
BXII. Phylum <i>Proteobacteria</i>	BXIII. Phylum <i>Firmicutes</i>
1. Alphaproteobacteria <i>Rickettsia, Bartonella, Brucella</i>	1. Clostridia <i>Clostridium, Peptostreptococcus, Eubacterium</i>
2. Betaproteobacteria <i>Burkholderia, Alcaligenes, Bordetella, Neisseria</i>	2. Mollicutes <i>Mycoplasma, Ureaplasma, Erysipelothrix (?)</i>
3. Gammaproteobacteria <i>Xanthomonas, Stenotrophomonas, Francisella, Legionella, Pseudomonas, Moraxella, Acinetobacter, Alteromonas, Vibrio, Enterobacteriaceae, Pasteurella, Haemophilus</i>	3. Bacilli <i>Bacillus, Listeria, Staphylococcus, Lactobacillus, Enterococcus, Leuconostoc, Streptococcus, Lactococcus</i>
5. Epsilonproteobacteria <i>Campylobacter, Helicobacter</i>	BXIV. Phylum <i>Actinobacteria</i>
BXVI. Phylum <i>Chlamydiae</i>	<i>Actinomycetales</i>
<i>Chlamydia, Chlamydophila</i>	<i>Actinomyces, Micrococcus, Brevibacterium, Corynebacterium, Mycobacterium, Propionibacterium, Streptomyces</i>
BXVII. Phylum <i>Spirochaetes</i>	<i>Bifidobacteriales</i>
<i>Borrelia, Treponema, Leptosira</i>	<i>Bifidobacterium, Gardnerella</i>
BXX. Phylum <i>Bacteroidetes</i>	
<i>Bacteroides, Flavobacterium</i>	
BXXI. Phylum <i>Fusobacteria</i>	
<i>Fusobacterium</i>	

Exercice : les bactéries lactiques

La classification des bactéries lactiques peut être confirmée par la détermination du GC%. Après extraction et purification du chromosome de *Lactococcus lactis*, on mesure l'absorbance de la solution d'ADN obtenue au cours d'un chauffage progressif (document n°1).

3.1. A quelle longueur d'onde les mesures sont-elles effectuées ? Justifier.

3.2. Définir et déterminer graphiquement (d'après le document n°1) le Tm.

3.3. Les valeurs de Tm et le pourcentage de GC de trois ADN d'origines diverses figurent dans le tableau suivant :

Origine	GC%	Tm (°C)
<i>Escherichia coli</i>	50	89,8
<i>Proteus</i>	35	83,7
<i>Clostridium</i>	28	80,8

Etablir l'équation de la droite GC% en fonction de Tm et justifier le signe de son coefficient directeur.

En déduire le GC% de la souche de *Lactococcus lactis* étudiée.

