

Plan de cours Micro-organismes S3

Cours 1. Microbiologie générale

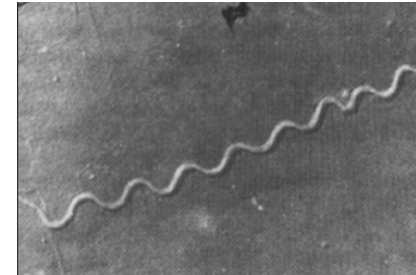
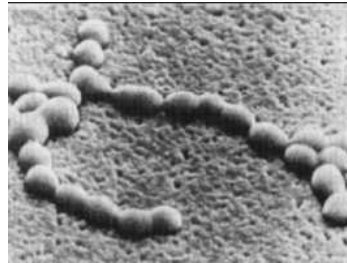
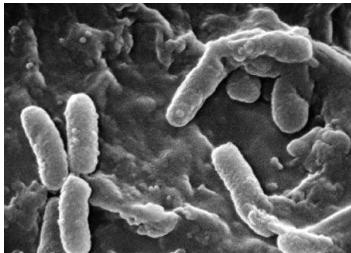
Cours 2. Nutrition bactéries

Cours 3. Croissance bactérienne

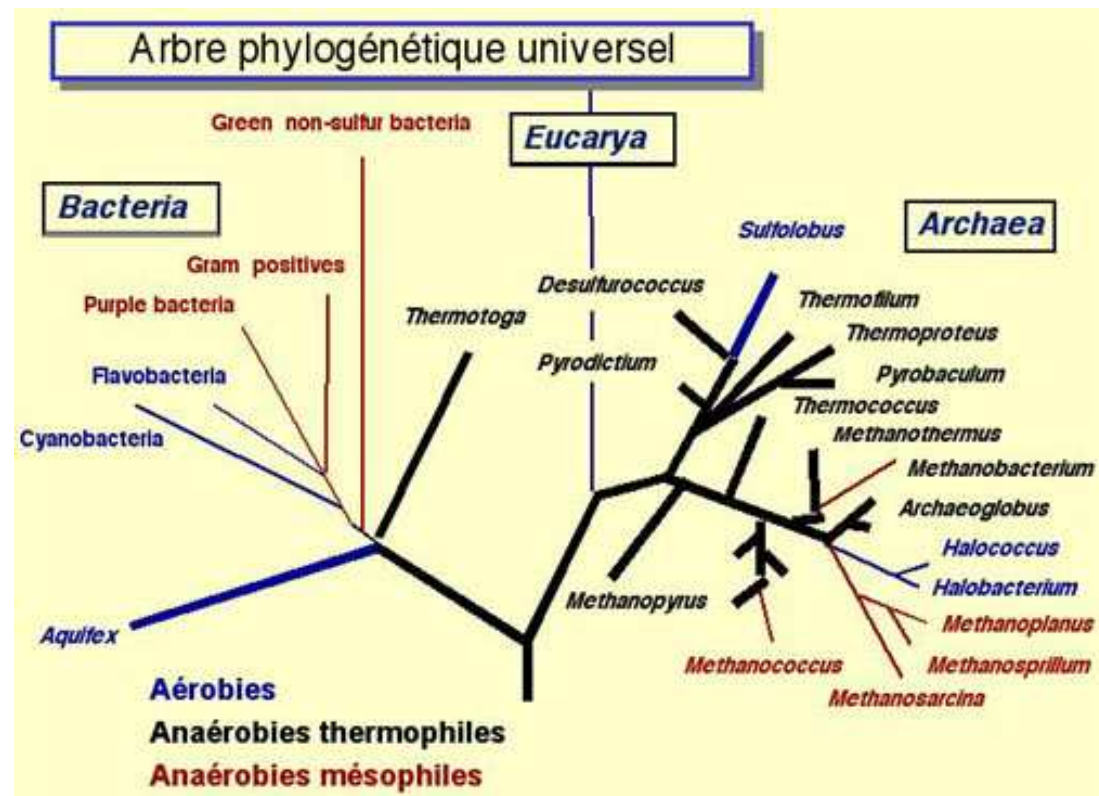
Cours 4. Métabolismes

Cours 5. Taxonomie

12h de cours; 5TP et 1 TD



Taxonomie bactérienne



- **Définition**
 - ➡ taxonomie
 - ➡ rangs taxonomiques
 - ➡ espèce
- **Nomenclature**
- **Classification et identification**
- **Différentes approches taxonomiques**
- **Arbre phylogénétique**

Définitions

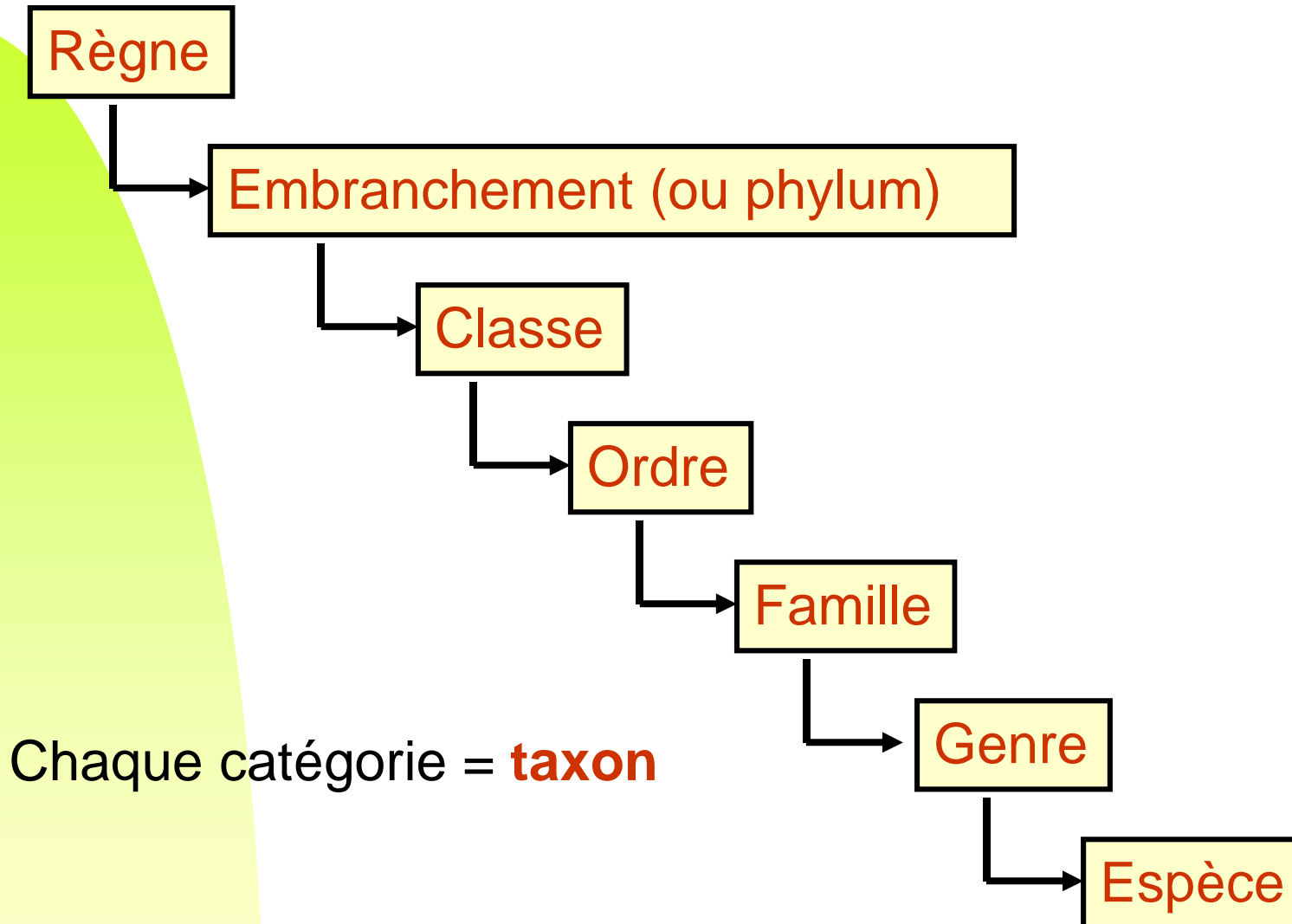
- **Taxonomie** : science de la classification biologique
exemple : des bactéries en groupes (familles, genres, espèces...).

Identification

Nomenclature

Classification

Rangs taxonomiques



Espèces

- Le groupe de base en taxinomie microbienne
- Souche: population d'organismes qui descend d'un organisme unique ou d'un isolat de culture pure
- Un ensemble de souche qui ont en commun plusieurs propriétés stables et qui diffèrent de façon significative des autres groupes de souches

Exemple : souches de *L.lactis*

L. lactis subsp. *lactis* ITAL 104
L. lactis subsp. *lactis* ITAL 179
L. lactis subsp. *lactis* ITAL 185
L. lactis subsp. *lactis* ITAL 187
L. lactis subsp. *lactis* ITAL 383
L. lactis subsp. *lactis* ITAL 387
L. lactis subsp. *lactis* ITAL 403
L. lactis subsp. *lactis* ITAL 404
L. lactis subsp. *lactis* ITAL 408
L. lactis subsp. *lactis* ITAL 435
L. lactis subsp. *lactis* ITAL 436
L. lactis subsp. *lactis* ITAL 437
L. lactis subsp. *lactis* ITAL 438

Nomenclature

- Tous les organismes vivants portent un nom scientifique (nomenclature binomiale)
- Composé de deux termes
 - ☞ Genre - Débutant par une Majuscule
 - ☞ Espèce - en minuscule
- s'écrit en *Italique*

Exemples:

Escherichia coli ou *Saccharomyces cerevisiae*

Escherichia coli

- O157: H7 (souche)
- *coli* (espèce)
- *Escherichia* (genre)
- Enterobacteriaceae (famille)
- Enterobacteriales (ordre)

Règles de nomenclature

Règne

Bacteria

Classe

Bacilli

Ordre

Lactobacillales

Famille

Streptococcaceae

Genre

Lactococcus

Lactococcus lactis

Différentes approches taxonomiques

Approches phénotypique

1. Taxonomie phénotypique

2. Taxonomie numérique

Approches génétique

1. Détermination du (G + C)%

2. Les hybridations d'acides nucléiques

3. Etude de diverses séquences génétiques

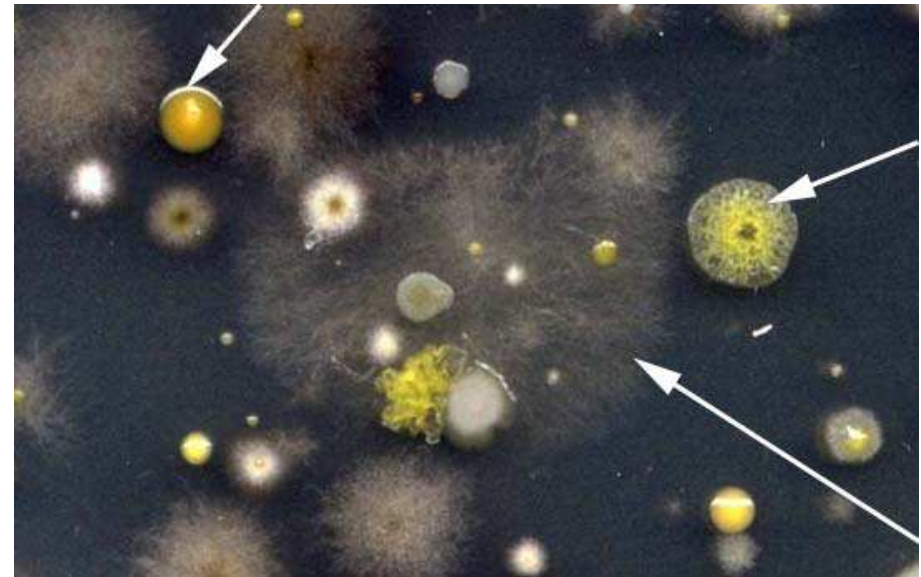
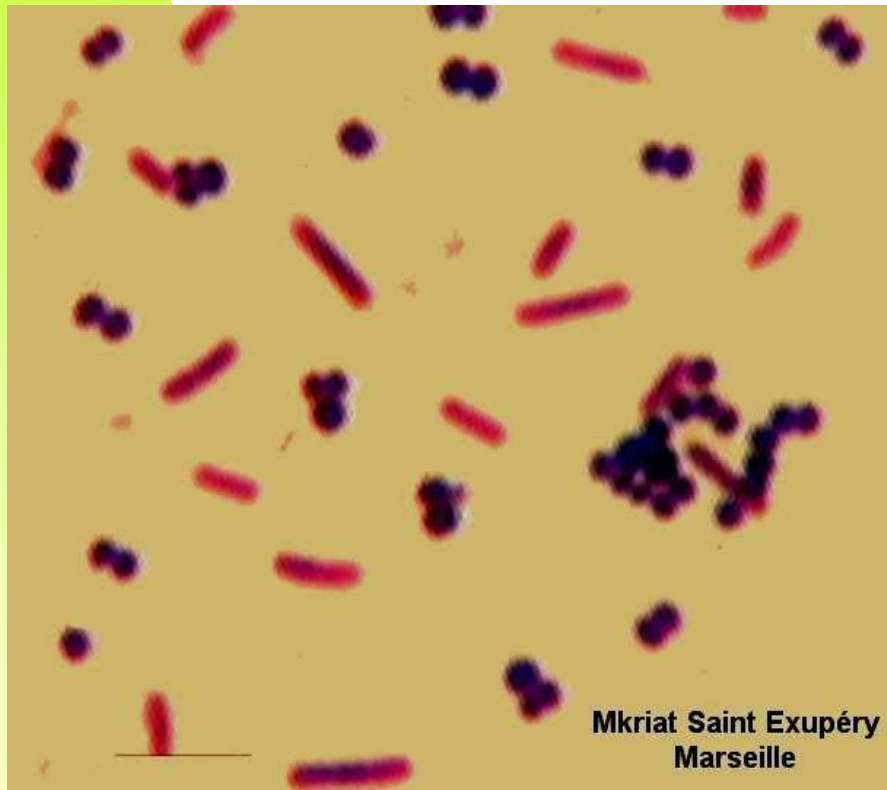
Approches Chimiotaxonomie

A - Taxonomie phénotypique

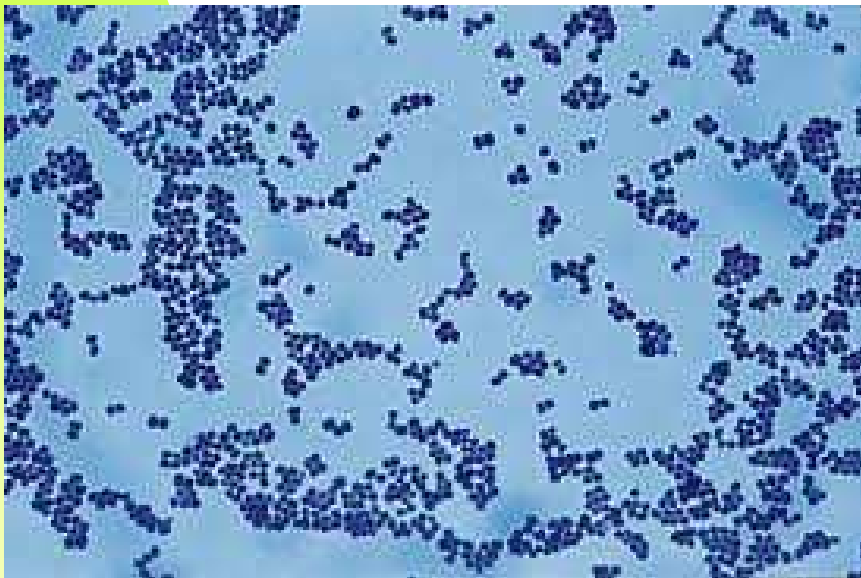
- Morphologie de cellule
- Coloration de Gram
- Capacité de produire du gaz méthane
- Source nutritive
- Métabolisme

A - Taxonomie phénotypique

Caractères morphologiques: Forme, taille,...

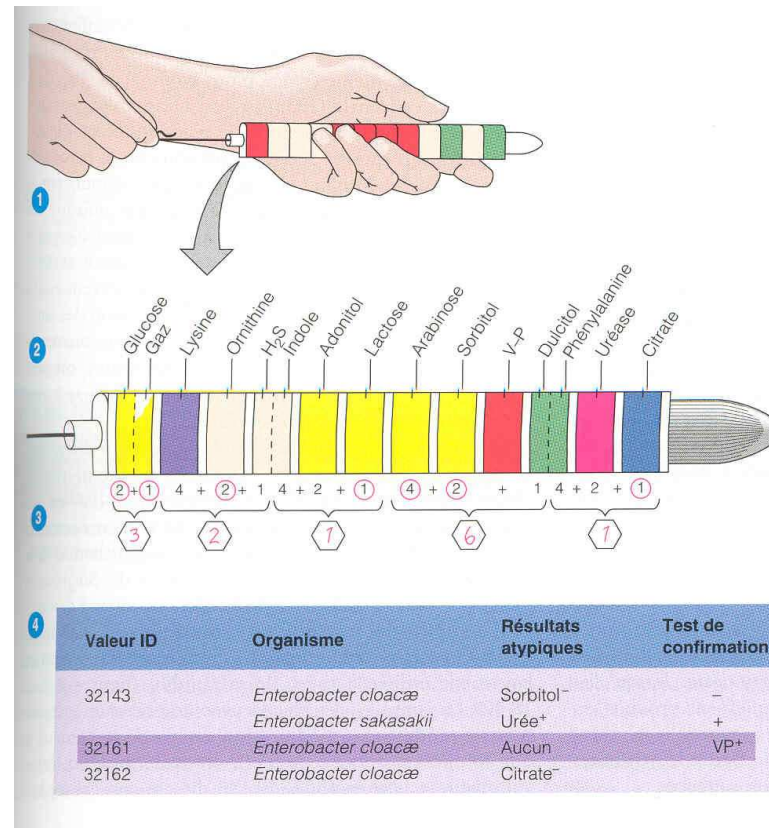


Coloration différentielle: coloration gram



A - Taxonomie phénotypique

Épreuve biochimique: présence des enzymes permettant d'utiliser certains substrats (glucose, citrate, nitrate, ornithineé...)



B - Taxonomie numérique

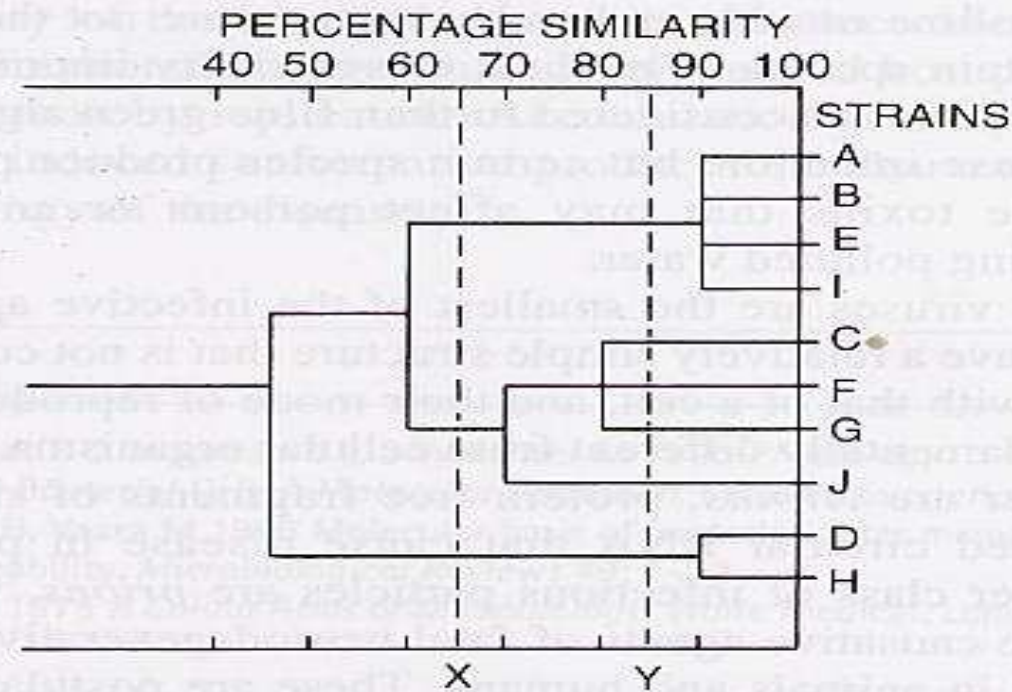


Fig. 3.1 A hierarchic taxonomic tree (*dendrogram*) prepared from similarity matrix data. The broken lines X and Y indicate levels of similarity at which separation into genera and species might be possible.

C - Chimiotaxonomie

Étude basée sur les constituants cellulaires

- ◆ **Paroi:**

- ☞ Acides gras, acides aminés, sucres

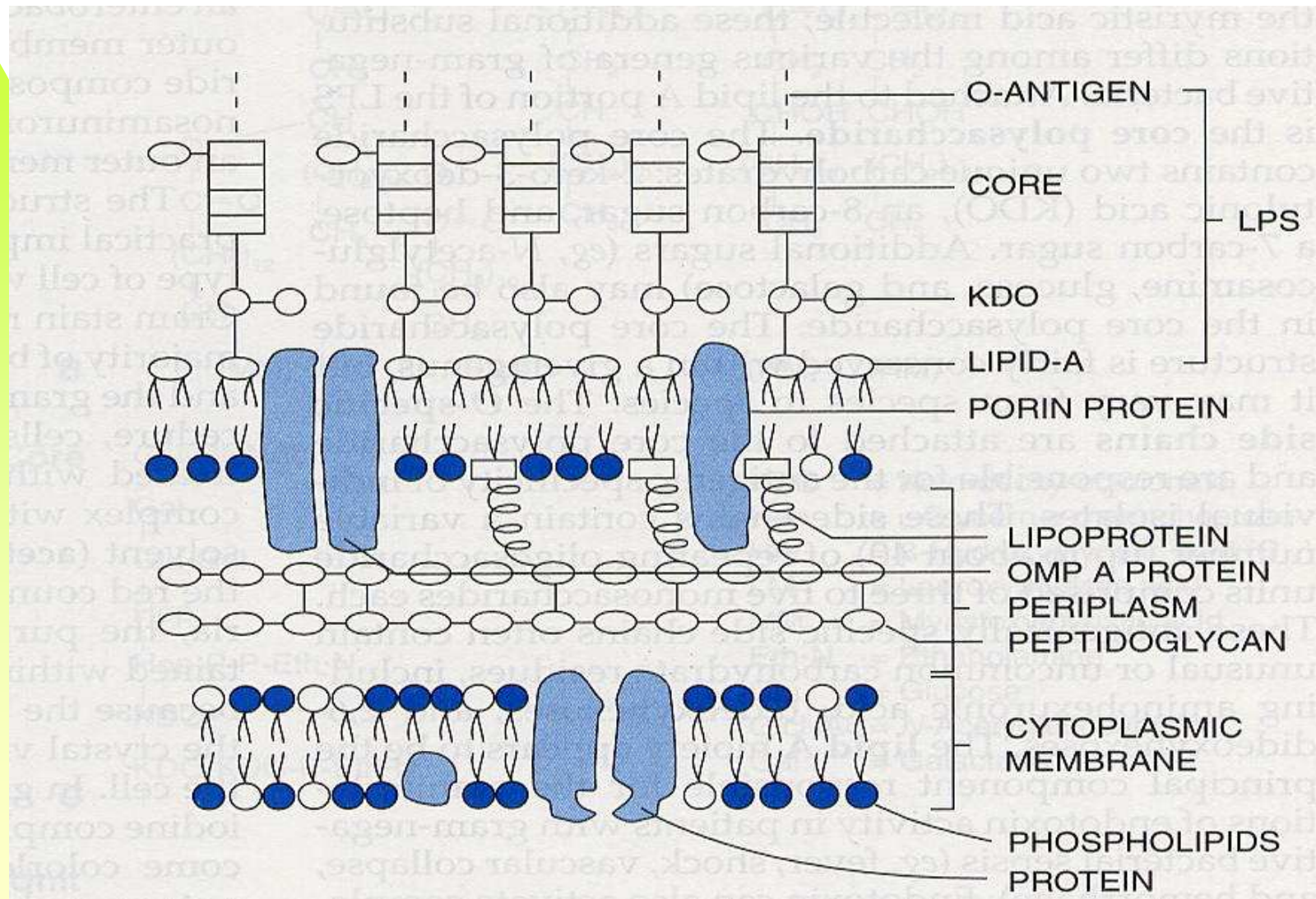
- ◆ **Membrane cellulaire**

- ☞ lipides

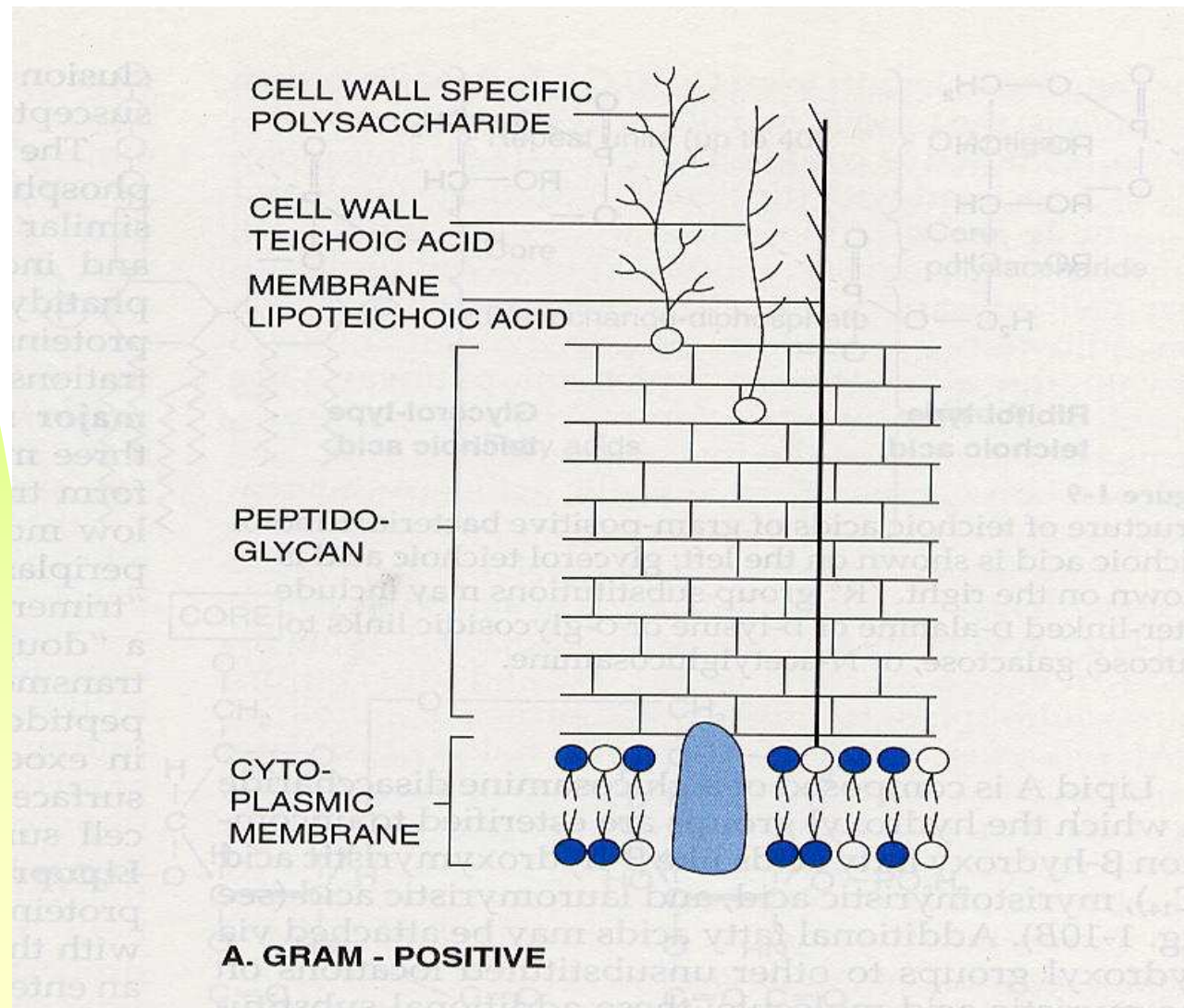
- ◆ **Cellule:**

- ☞ protéines

Bactéries Gram négatif



Bactéries gram positif



Cellules

■ Protéines cellulaires:

- ◆ Détermination des profils électrophorétiques de l'ensemble des protéines. Possibilité de révéler ensuite certaines protéines particulières (zymogrammes pour les enzymes, Western-Blot pour les antigènes)

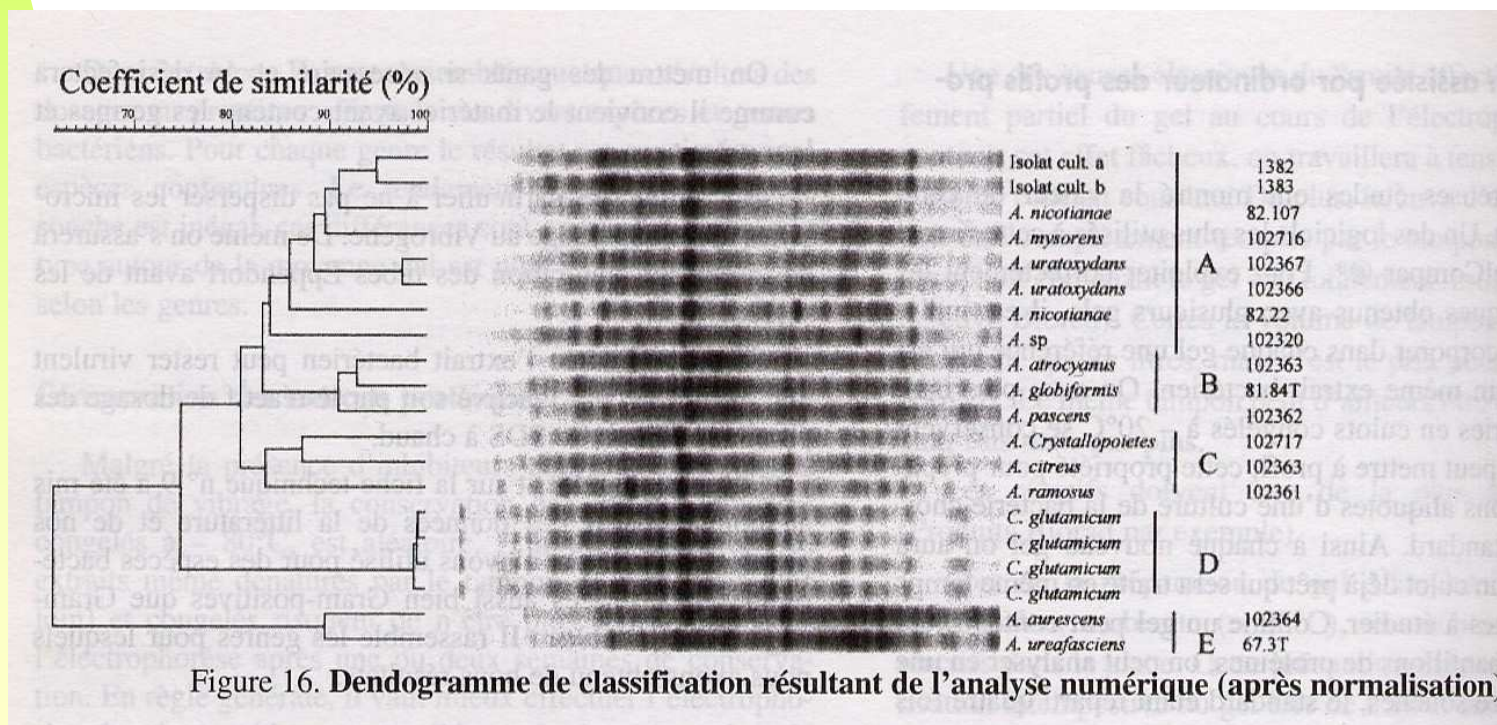


Figure 16. Dendrogramme de classification résultant de l'analyse numérique (après normalisation).

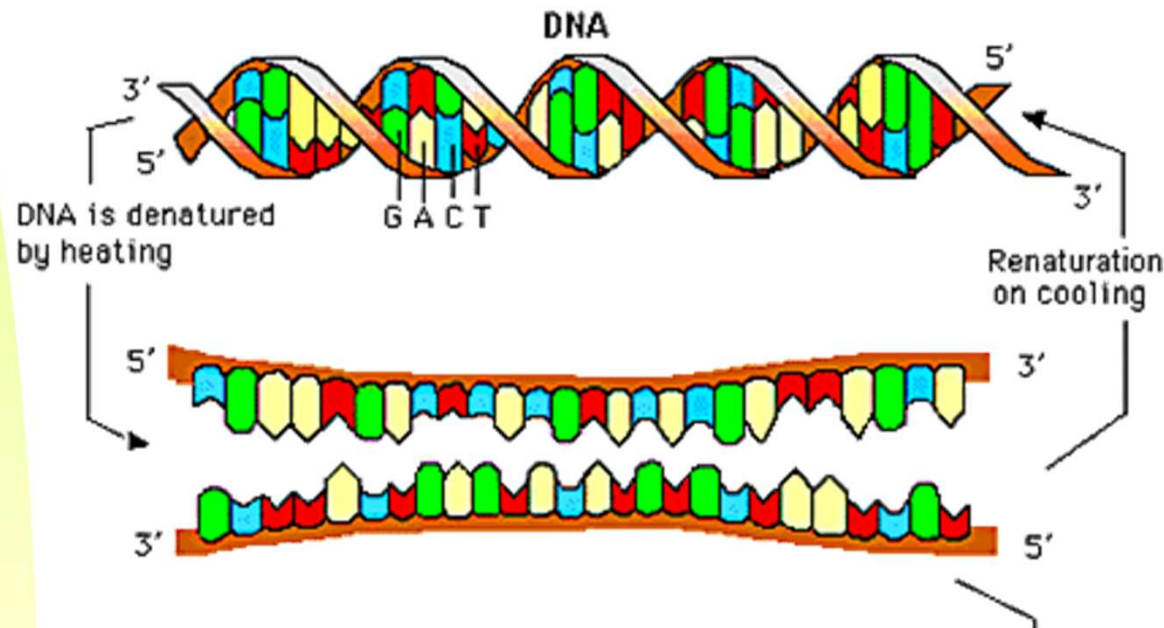
Caractéristiques chimiotaxonomiques

	ACIDES MYCOLIQUES	ACIDES AMINES	ARABINO- GALACTANNE	MENAQUINONES	ACIDES GRAS CELLULAIRES
<i>Corynebacterium</i> ^f	V (C22-38)	meso-DAP	+	MK-8 (H2), MK-9 (H2)	18:1, 16:0, 18:0
<i>Dietzia</i>	+(C34-38)	meso-DAP	+	MK-8 (H2)	16:0, 18:1
<i>Gordonia</i>	+(C48-66)	meso-DAP	+	MK-9 (H2)	16:0, 18:1
<i>Rhodococcus</i>	+(C34-64)	meso-DAP	+	MK-8 (H2)	16:0, 18:1
<i>Actinomyces</i>	—	L-lys/L-Om	—	MK-10 (H4)	16:0, 18:1 (ωC9) 18:0
<i>Arcanobacterium</i>	—	L-lys	—	MK-9 (H4)	16:0, 18:1 (ωC9) 18:0
<i>Arthrobacter</i>	—	L-lys	—	MK-8, MK-9, MK-9 (H2)	15:0 ai, 17:0 ai, 15:0 i
<i>Brevibacterium</i>	—	meso-DAP	—	MK-8 (H2) MK-7 (H2)	15:0 ai, 17:0 ai, 16:0 ai
<i>Cellulomonas</i>	—	L-Om	—	MK-9 (H4)	15:0 ai, 16:0
<i>Dermabacter</i>	—	meso-DAP	—	MK-9, MK-8, MK-7	17:0 ai, 15:0 ai, 16:0 i
<i>Microbacterium</i>	—	L-lys	—	MK-12, MK-11, MK-10	15:0 ai, 17:0 ai, 16:0 i
<i>Oerskovia</i>	—	L-Om	—	MK-9 (H4)	15:0 ai, 15:0 i, 17:0 ai
<i>Leifsonia</i>	—	DL-DAB	—	MK-11, MK-10	17:0 ai, 15:0 ai, 16:0 i
<i>Propionibacterium</i>	—	LL-DAP	—	MK-9 (H4)	15:0, 15:0 ai, 16:0
<i>Rothia</i>	—	L-lys	—	MK-7	15:0 ai, 17:0 ai, 16:0
<i>Turicella</i>	—	meso-DAP	+	MK-10 (H2) MK-11 (H2)	18:1, 16:0, 18:0

^a : *C. amycolatum* et *C. kroppenstedtii* ne contiennent pas d'acides mycoliques

D-Taxonomie moléculaire (génomique)

- ◆ Détermination G+C %
- ◆ Hybridation ADN/ADN total
- ◆ Séquençage de gènes

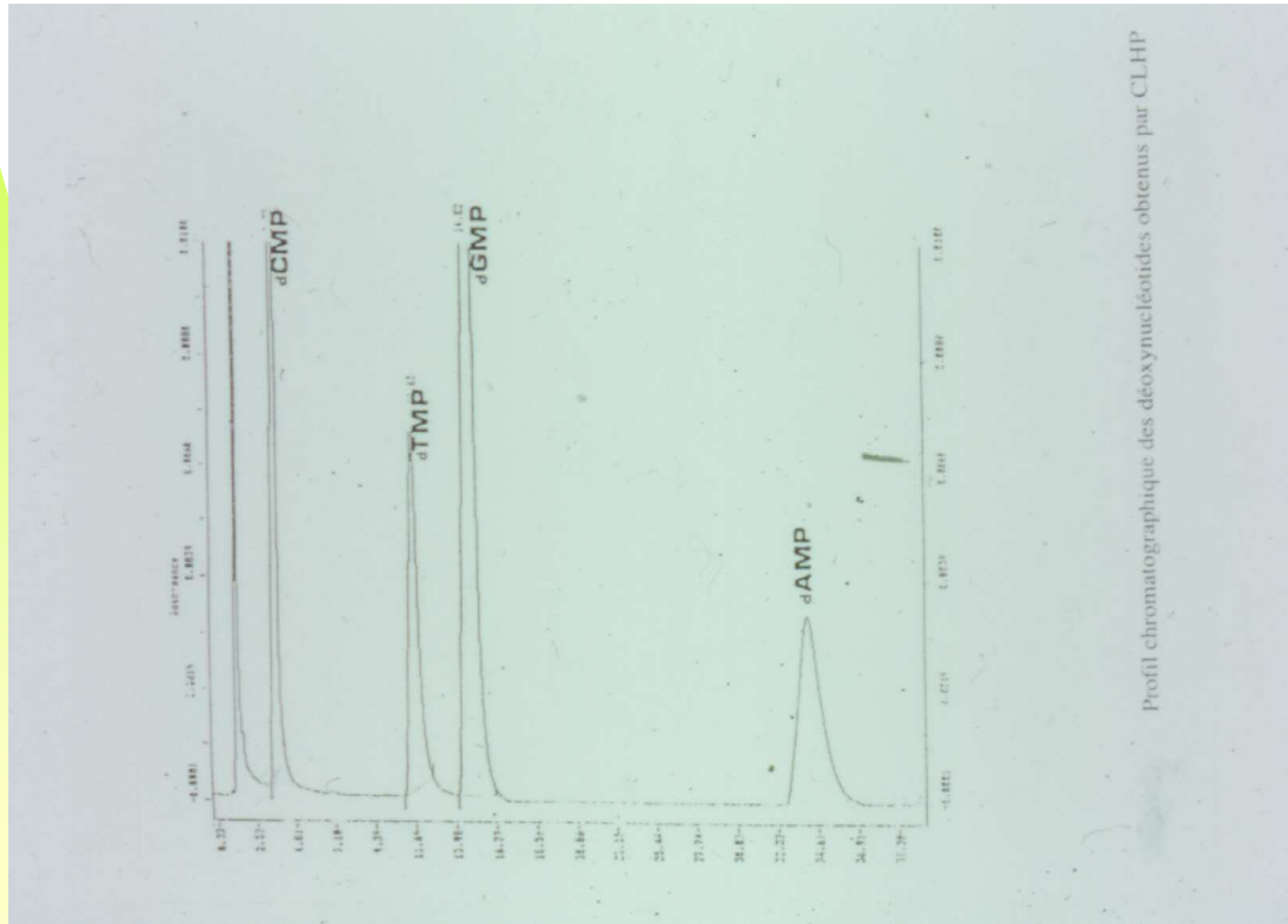


1) Détermination G+C % de l'ADN

$$G+C \% = \frac{(G + C)}{(G + C + A + T)} \times 100$$

- Détermination:
 - ◆ Densité de l'ADN
 - ◆ Température de demi-dénaturation (T_m)
 - ◆ Chromatographie des nucléotides après hydrolyse complète de l'ADN: CCM, HPLC, électrophorèse capillaire

Détermination G+C % de l'ADN par HPLC



G + C % valeurs

Tableau I. Valeurs du G+C % pour quelques bactéries rencontrées en microbiologie clinique

<i>Treponema pallidum</i>	52
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
<i>Legionella pneumophila</i>	39
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	50-52
<i>Kingella kingae</i>	47
<i>Brucella melitensis</i>	57
<i>Escherichia coli</i> K12	52
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	56-58
<i>Proteus vulgaris</i>	39
<i>Morganella morganii</i>	50
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	46
<i>Vibrio cholerae</i>	48
<i>Eikenella corrodens</i>	57
<i>Staphylococcus aureus</i>	32-36
<i>Streptococcus agalactiae</i>	34
<i>Bacillus subtilis</i>	42-46
<i>Clostridium perfringens</i>	24-27
<i>Listeria monocytogenes</i>	36-38

Variation entre 25 et 75 % entre les espèces

Différence > de 5 % = pas même espèce.

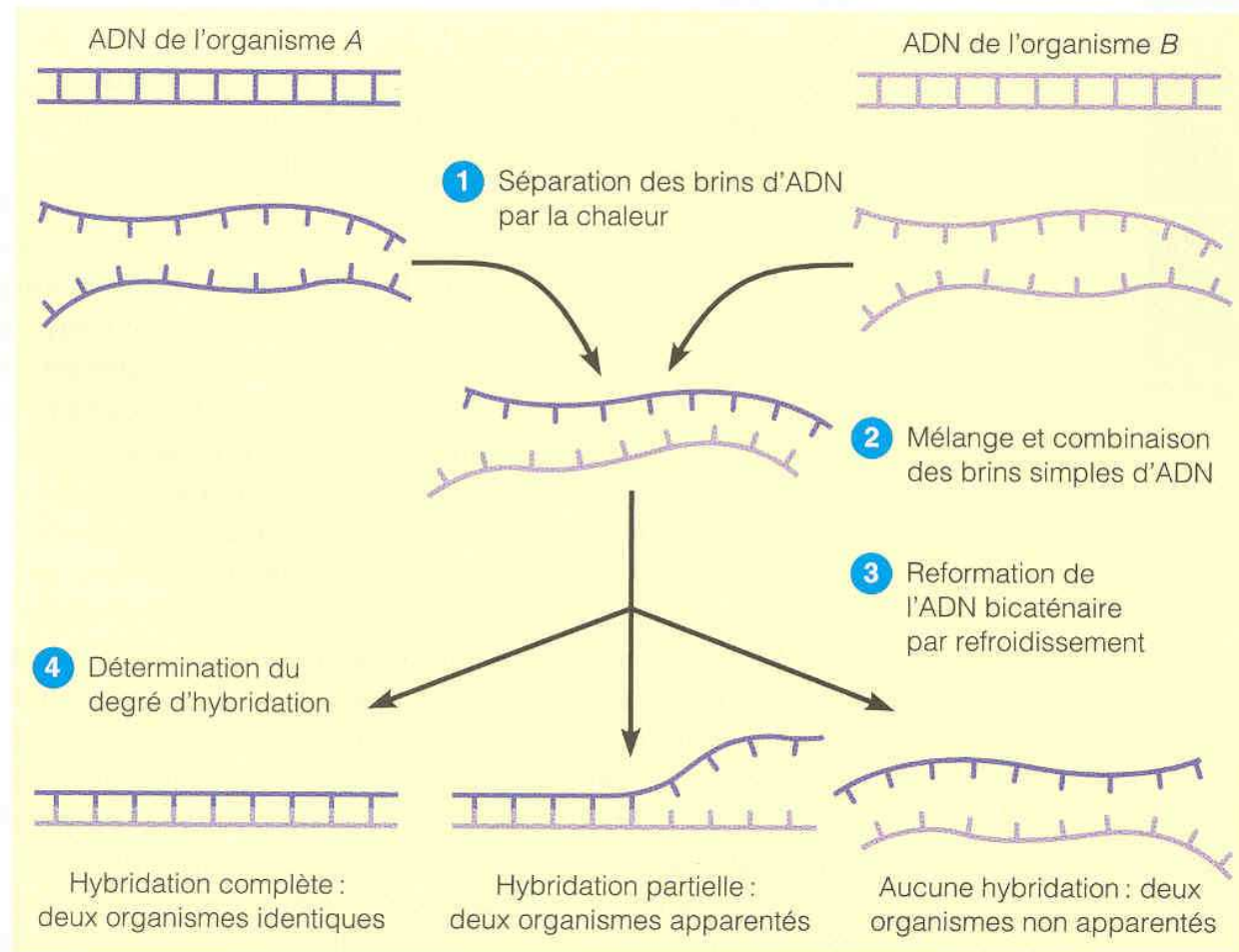
Différence > de 10 % = pas même genre.

(G+C) % identique = pas forcément les bactéries proches

2) Hybridations ADN/ADN

- Détermination des espèces.
- Estimation de la similarité de deux ADN en attendant le séquençage rapide de génomes
 - ◆ même espèce: > 70 %
 - ◆ même genre: 1 à 60%
 - ◆ genres différents: < à 5 %

Hybridation des chaînes complémentaires d'ADN et/ou d'ARN



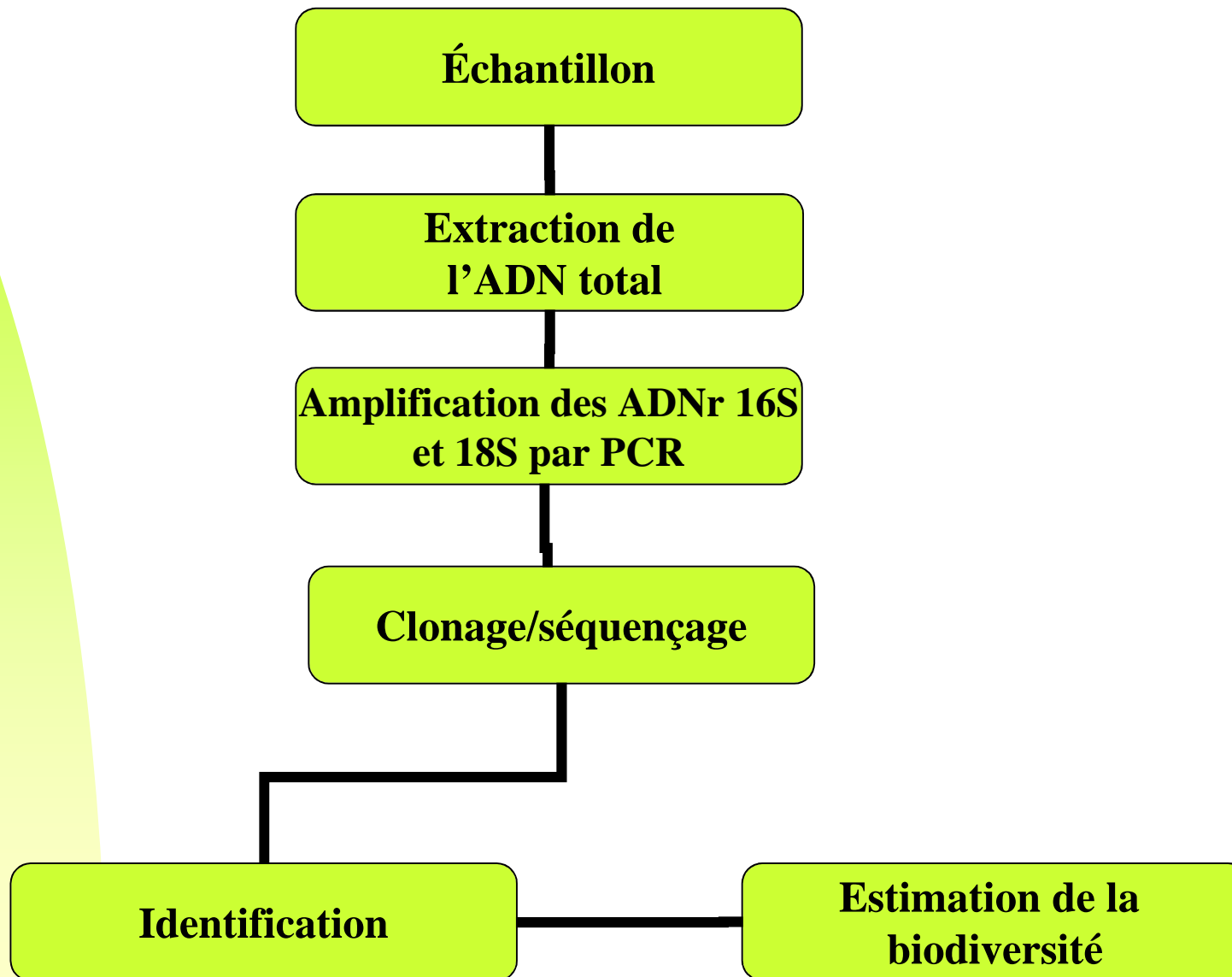
3) Étude de diverses séquences génétiques

Retenue repose essentiellement sur les séquences des **ADNr 16S**.

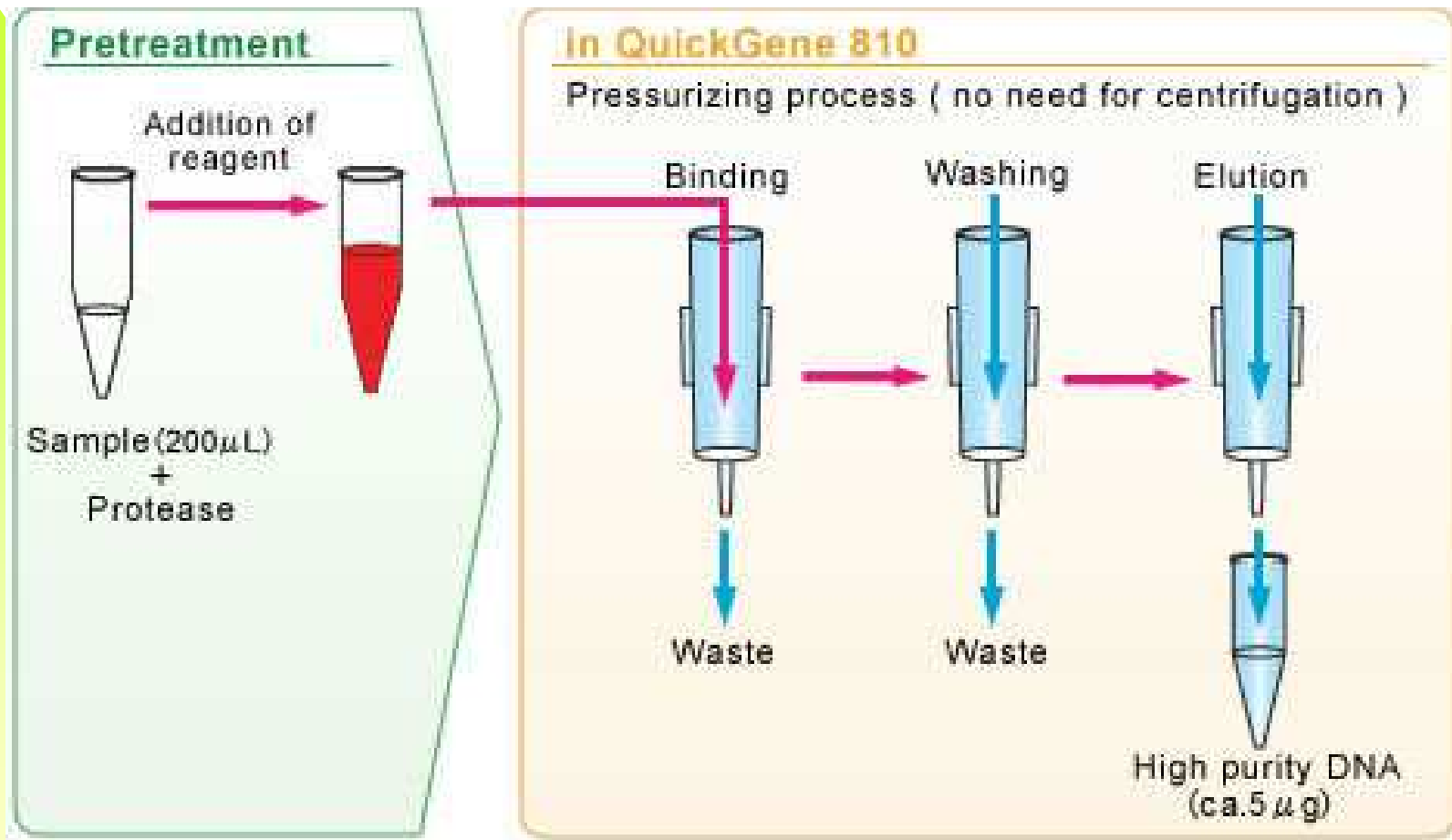
Pour trois raisons principales :

- présence dans toutes les cellules
- structure bien conservée
- faciles à purifier.

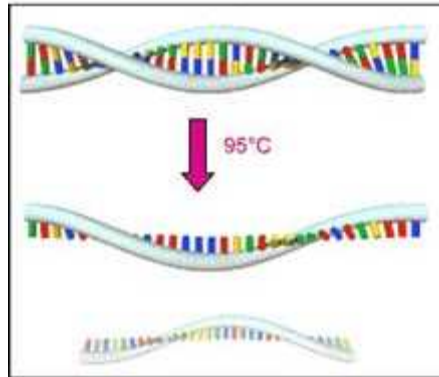
Méthodologie basée sur l'ARNr 16S



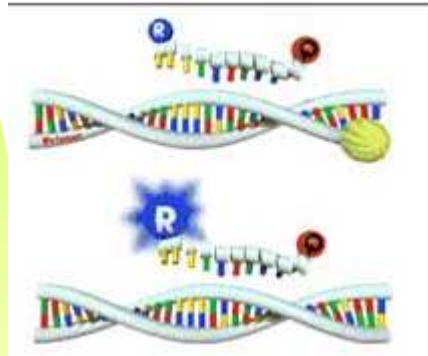
Extraction de l'ADN total



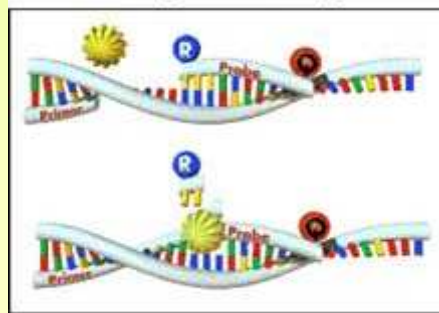
Amplification des ADNr 16S par PCR



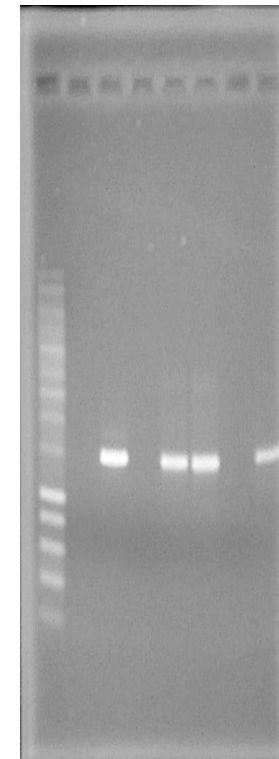
dénaturation
(94°C, 1 min)



hybridation
(60°C, 1 min)



élongation (72°C,
2 min)



ADNr 16S
amplifiés

Animation :

Séquençage de gène

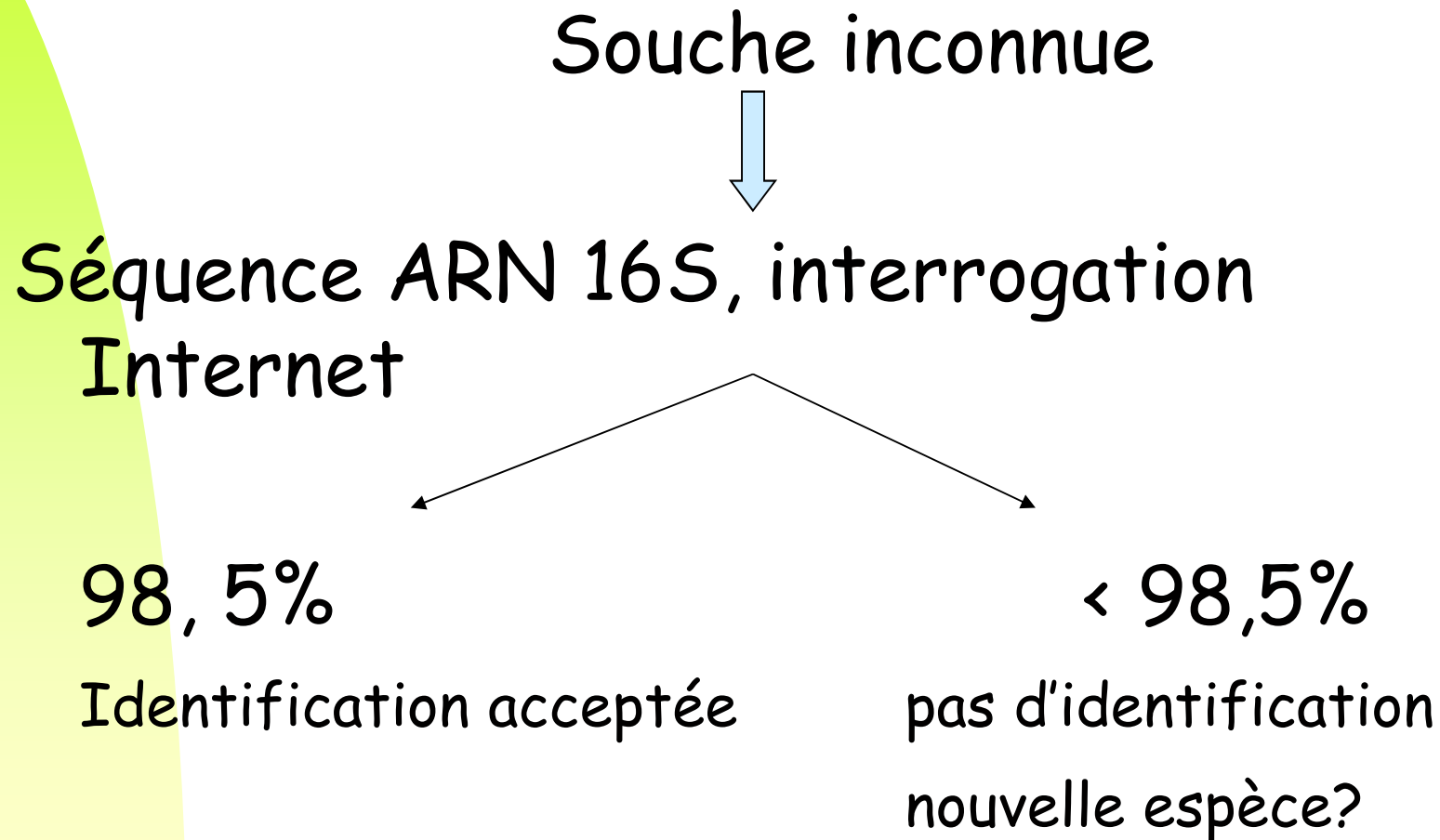
taxon 1 ACCAG-TCGTACTGCCAGTAC-CTGACATGCCAGTCAGA
taxon 2 ACCAG-TCGTGCTGCC-CAT--CTGACATGACA-TCAGA
taxon 3 ACCTG-TCGTGCAGCCGCGT--CTGTCCTGCCAGTCGGA
taxon 4 ACCTGGTCGTACTGCC-CATA-CTGGCCTGTCAAGTCAGA
taxon 5 ACTTG-TCGTACTGCCGTGCAACTGGCCTGTCAAGTCAGA

insertion

*zone variable qui sera exclue des
analyses car l'homologie des
sites est impossible à déterminer*

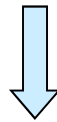
délétion

Stratégie d'identification bactérienne

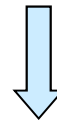


Stratégie taxonomique

Taxon connu mais très hétérogène phénotypiquement



Plusieurs groupes par taxonomie numérique



Confirmation de ces groupes par hybridation ADN/ADN



Séquence ARN16S des représentants de ces groupes

>98,5%

Mêmes espèce, sous espèces?

< 98,5 %

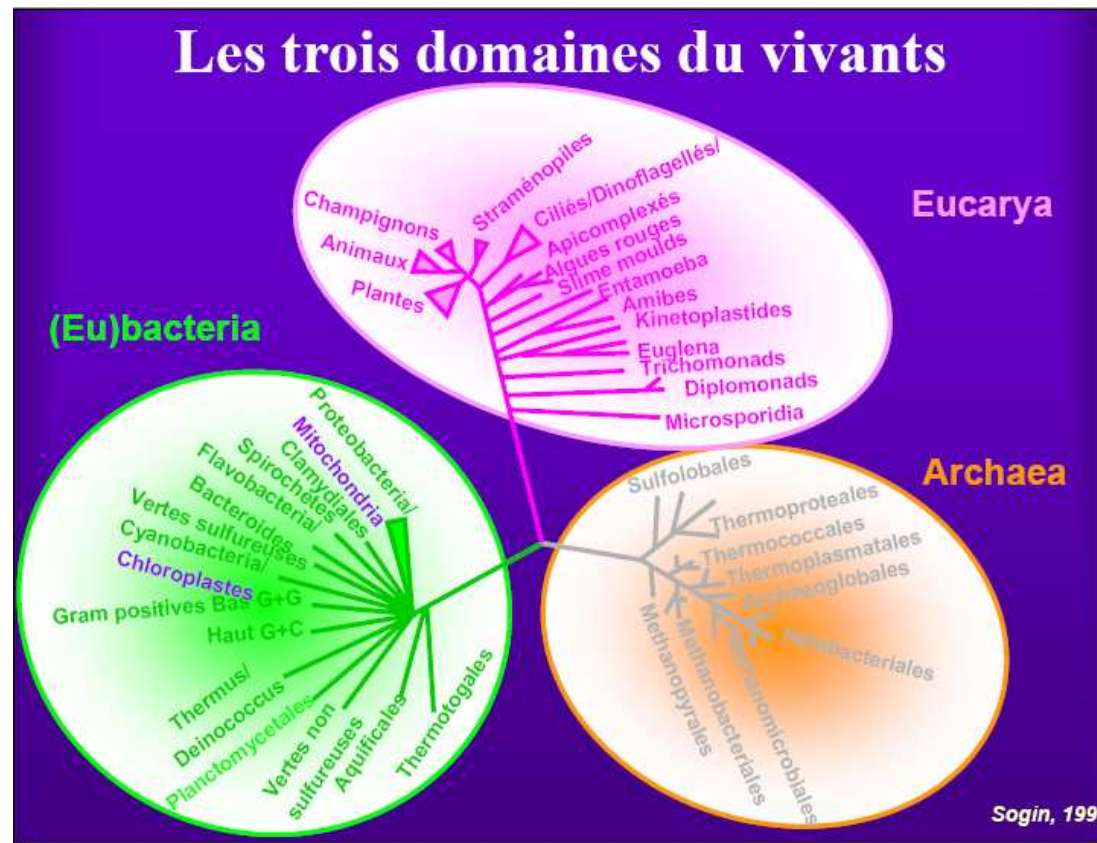
nouvelles espèces

Interprétation des séquences

- Niveau d'homologies des séquences: exprimés en % d'homologie ou en % de divergences.
- Actuellement, les seuls critères taxonomiques concernent la comparaison des gènes de l'ARN 16S:
 - ◆ Plus de 97,5 % d'homologie, même genre mais seulement possibilité de même espèce, faire des hybridations ADN/ADN.
 - ◆ Entre 90 et 97,5%: espèces différentes, a priori même genre, à conforter par chimiotaxonomie.
 - ◆ Moins de 90%: a priori genres différents
- Pour les autres gènes:
 - ◆ étude phylogénétique
 - ◆ études taxonomiques pour des genres dont l'ARN 16S est très similaire

Arbre phylogénétique

Un arbre phylogénétique est un arbre qui montre les relations de parentés entre des entités supposées avoir un ancêtre commun.



Méthodes de reconstruction phylogénétique

méthodes de distances

Choix d'un critère de **distance** puis calcul d'un **indice de similitude globale** entre les groupes (ou espèces) pris(es) deux à deux

méthode UPGMA ou Neighbour Joining

méthodes de caractères

(séquences → arbre phylogénétique)

- méthodes de parcimonie (maximum parcimonie)
- méthodes probabilistes (maximum de vraisemblance, inférence bayésienne)

Exemple : méthode UPGMA

Regroupe ensemble les séquences les plus proches.

(A) Méthode UPGMA

Ce tableau décrit une région de 9 bases dans les ARNr 16S de quatre souches.

Organisme (souche)	Nombre de sites								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
a	G	C	G	G	A	C	A	A	A
b	G	A	C	G	C	C	A	A	G
c	G	A	A	A	U	C	U	A	A
d	G	A	A	A	G	C	U	A	G

1 Construction d'une matrice de distance montrant la parenté (distance d) entre les souches en vue de déterminer les plus proches, dans ce cas, c et d.

Première matrice

	a	b	c
b	$d_{ab} = 4$	—	—
c	$d_{ac} = 5$	$d_{bc} = 5$	—
d	$d_{ad} = 6$	$d_{bd} = 4$	$d_{cd} = 2$

Premier arbre



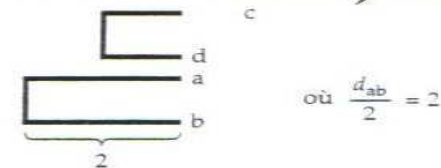
2 Diagramme de la parenté entre les deux souches.

3 Construction d'une deuxième matrice pour tester la distance entre les deux groupes associés (cd) et les deux souches (a et b).

Deuxième matrice

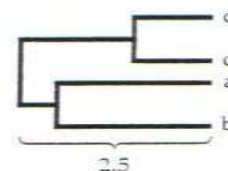
	(cd)	a
a	$d_{(cd)a} = 11/2$	—
b	$d_{(cd)b} = 9/2$	$d_{ab} = 4$

Deuxième arbre



4 Comme a et b sont proches l'une de l'autre, détermination de leur parenté.

Arbre final



5 Détermination de la parenté entre ac et (a et b), et tracé d'un diagramme.

$$\text{où } d_{(cd)(ab)} = \frac{(11/2 + 9/2)/2}{2} = 2.5$$