



Systematique microbienne:

**Identification et classification taxonomique des micro-organismes.
(Partie1)**

Pr Sari L



Il est impératif de connaître les caractéristiques phénotypiques, génotypiques et biologiques d'un micro-organisme afin de le différencier des organismes pathogènes et/ou toxigènes apparentés ou des autres organismes nuisibles pour la santé végétale, animale, humaine et pour l'environnement.

1. Approche polyphasique de l'identification microbienne

- ▶ La sélection de la ou des méthodes utilisées pour l'identification microbienne dépend du type et de la nature du micro-organisme.
- ▶ Ces méthodes doivent permettre l'identification des organismes aux niveaux du genre, des espèces et, si possible, de la souche.



Les forces et les faiblesses des diverses méthodes d'identification doivent être prises en considération, de sorte que les méthodes choisies se complètent les unes les autres, ayant pour résultat une identification concluante et définitive du micro-organisme et permettant une différenciation nette de l'organisme par rapport aux autres espèces et souches pathogènes et/ou toxigènes étroitement apparentées.

- 
- ▶ **La méthode de typage** doit permettre une différenciation plus précise entre des souches de la même espèce.
 - ▶ Plusieurs critères peuvent être considérés pour l'évaluation de ces méthodes.
 - ▶ **La typabilité** est la capacité à obtenir un résultat positif, non-ambigu pour chaque souche ; les souches non typables sont celles dont le typage ne donne pas de résultat ou un résultat ininterprétable.

- 
- ▶ **La reproductibilité** est la capacité de la méthode à donner le même résultat lorsque la même souche est testée plusieurs fois ; ce critère peut être affecté par des variations des résultats d'un jour à l'autre ou par des variations dans la stabilité des caractéristiques microbiennes étudiées.
 - ▶ **Le pouvoir discriminant** est la capacité à différencier plusieurs souches non apparentées. Idéalement, une méthode de typage qui identifiera chaque souche comme unique.
 - ▶ Pratiquement, la méthode peut être considérée comme utile lorsque la probabilité que deux souches non apparentées appartiennent au même type soit inférieure à 5 %.
 - ▶ Plus le pouvoir discriminant augmente, plus la méthode est capable, par définition, de détecter des variations minimales ou moins fréquentes.

- 
- ▶ En général, deux souches appartenant à des types différents peuvent raisonnablement être considérées comme non apparentées.
 - ▶ Cependant la conclusion que deux souches du même type sont **identiques**, ou appartiennent au même **clone**, dépend du pouvoir discriminant de la méthode utilisée et de la diversité génétique de la population des souches examinées.

- 
- ▶ Il faut être attentif au fait que des méthodes ayant un pouvoir discriminant élevé peuvent devenir si sensibles qu'elles détecteront des différences qui n'ont aucun intérêt épidémiologique tel que des mutations spontanées.
 - ▶ Actuellement, certaines méthodes disponibles sont capables de détecter les plus petites variations génétiques qui peuvent apparaître au cours d'une épidémie ou d'une infection.
 - ▶ Ces observations bouleversent le concept de **clone** et suggèrent qu'il est plus utile de considérer la clonalité comme un phénomène relatif plutôt qu'un concept absolu.

- 
- ▶ Ce problème de classification des souches « **similaires** » est implicitement reconnu par la désignation de **types** et de **sous-types** dans l'interprétation des résultats obtenus par beaucoup de méthodes de typage.
 - ▶ Des souches qui diffèrent peu d'un type donné sont considérées comme appartenant à un même sous-type.

- 
- ▶ Un système idéal de typage devrait de plus être standardisé, applicable à beaucoup d'organismes, rapide, facilement disponible et bon marché.
 - ▶ Malheureusement, il n'existe pas de méthode de typage idéale, et il faudra avoir recours dans certains cas à plusieurs méthodes.
 - ▶ Les systèmes de typage peuvent être classés en deux grandes catégories :

Les systèmes de typage peuvent être classés en deux grandes catégories :

- ▶ les techniques **phénotypiques** (qui détectent des caractères exprimés par les micro-organismes)
- ▶ et les techniques **génotypiques** (qui se basent directement sur des caractères de l'ADN chromosomique ou extra-chomosomique).

2. Analyse phénotypique

- ▶ L'analyse préliminaire dans l'identification microbienne se fait souvent avec une ou plusieurs méthodes phénotypiques.
- ▶ Les méthodes phénotypiques conviennent aux micro-organismes qui sont cultivables (c.-à-d., qui peuvent croître en culture pure sur un milieu artificiel) et qui ont des paramètres de croissance, ainsi qu'un profil physiologique et biochimique bien établis.

2.1. Analyse des caractères morphologiques

- ▶ Ces méthodes utilisent les colonies et la morphologie des cellules afin d'obtenir une identification initiale du micro-organisme.
- ▶ On y parvient en isolant simplement le micro-organisme, en le cultivant et par la suite en l'observant visuellement à l'aide d'un microscope.
- ▶ Les propriétés morphologiques comprennent : la forme, la taille, les caractéristiques superficielles et la pigmentation, les caractéristiques des parois cellulaires (coloration de Gram), les caractéristiques de sporulation, les mécanismes de motilité et les autres inclusions cellulaires et caractéristiques ultrastructurales.

2.2. Analyses des caractéristiques biochimiques, physiologiques et métaboliques

- ▶ Les méthodes d'identification phénotypiques comprennent l'étude du profil biochimique et des propriétés métaboliques d'un micro-organisme par l'entremise de test sur ses conditions de croissance, sur ses activités enzymatiques et sur la composition de ses cellules en acides gras.
- ▶ Les tests biochimiques utilisent des milieux de croissance, des éléments nutritifs, des produits chimiques ou des conditions de croissance spécifiques pour provoquer une réponse biochimique observable et mesurable chez le micro-organisme, ce qui permet du même coup son identification et sa caractérisation.

Ces tests comprennent :

- ▶ l'utilisation de sources de carbone et d'azote,
- ▶ différentes conditions de croissance (anaérobie ou aérobie; température optimale et intervalle de températures, pH optimal et intervalle de pH),
- ▶ des conditions osmotiques préférentielles,
- ▶ la production de produits de fermentation,
- ▶ la production d'enzymes,
- ▶ la production de composés antimicrobiens,
- ▶ de même que la sensibilité aux inhibiteurs métaboliques et aux antibiotiques.

Parmi les tests reconnus, on retrouve:

- ▶ les tests au rouge de phénol et carbohydrate,
- ▶ les tests de catalase et d'oxydase,
- ▶ les tests d'oxydation / fermentation,
- ▶ les tests au rouge de méthyle,
- ▶ les tests de Voges-Proskauer,
- ▶ la réduction des nitrates,
- ▶ l'hydrolyse de l'amidon,
- ▶ l'hydrolyse du tryptophane,
- ▶ la production de sulfure d'hydrogène,
- ▶ l'utilisation du citrate.....



Plusieurs systèmes commerciaux miniaturisés et automatisés sont actuellement offerts et sont assortis de procédures de contrôle de la qualité bien définies qui permettent l'identification rapide des micro-organismes.

2.1.1. Le biotypage

- ▶ L'utilisation du biotypage pour différencier des souches de même espèce est basée sur des propriétés comme l'aspect morphologique, les réactions biochimiques et des caractéristiques vis à vis de l'environnement (croissance à des pH ou températures extrêmes).
- ▶ L'avantage de cette méthode est qu'avec les systèmes d'identification vendu sur le commerce, un profil biochimique, ou biotype, est automatiquement généré par le processus d'identification de routine (exemple : systèmes API).
- ▶ Malheureusement, le biotype n'est pas une propriété stable et peut être influencé aussi bien par une variété de facteurs techniques et environnementaux que par le gain ou la perte d'un plasmide.

2.1.2. L'antibiogramme

- ▶ L'utilisation de l'antibiogramme en épidémiologie se base sur la détermination de la susceptibilité ou de la résistance d'un organisme à une palette d'antibiotiques.
- ▶ Cette méthode est attractive car elle est facilement réalisable par le laboratoire puisqu'elle ne demande pas d'équipement sophistiqué et exploite souvent les données provenant directement des analyses de routine.
- ▶ Cependant, son désavantage majeur est représenté par son faible pouvoir discriminant et par la variabilité génétique de la résistance aux antibiotiques.
- ▶ Cette variabilité est souvent déterminée par la présence ou l'absence de plasmides portant des marqueurs de résistance.

- 
- ▶ Certains auteurs ont proposé l'utilisation de toute l'information donnée par un antibiogramme obtenu par la méthode de Kirby-Bauer (analyse multivariée des diamètres des zones d'inhibition).
 - ▶ Par un choix judicieux des antibiotiques utilisés, cette méthode s'est révélée être d'une bonne stabilité et de qualité comparable aux méthodes moléculaires dans le cas du staphylocoque doré résistant à la méthicilline.

2.1.3. La sérotypie

- ▶ La sérotypie des bactéries est basée sur la présence ou l'absence de déterminants antigéniques somatiques, flagellaires et capsulaires et de leur réaction avec des antisera spécifiques.
- ▶ La sérotypie a été l'un des outils classiques pour l'étude de l'épidémiologie de certains micro-organismes (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp.).
- ▶ Pour l'évaluation de certaines bactéries, comme *Salmonella* et *Shigella*, cette méthode est rapide, simple et facilement applicable.
- ▶ Elle est standardisée pour *P. aeruginosa* et *E. coli*.
- ▶ Cependant, les antisera spécifiques sont souvent chers et pas toujours commercialisés.
- ▶ De plus, même pour les espèces qui ont un grand nombre de variants antigéniques, ces méthodes ont un faible pouvoir de discrimination et une faible typabilité.

2.1.4. La lysotypie

- ▶ L'utilisation de la lysotypie est basée sur la susceptibilité des souches testées à être lysées par un large spectre de bactériophages sélectionnés pour offrir un maximum de discrimination entre les souches d'une même espèce.
- ▶ Cette méthode a été développée pour certains pathogènes nosocomiaux (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, et *Salmonella* spp.).
- ▶ Les désavantages principaux sont un manque de standardisation et une faible reproductibilité.
- ▶ De plus, la méthode est complexe et les souches phagiques sont souvent difficiles à obtenir ; de ce fait la méthode n'est utilisable que dans des laboratoires de références.

2.1.5. Le typage par les bactériocines

- ▶ Cette méthode se base sur la sensibilité de certaines souches vis-à-vis de produits toxiques élaborés par d'autres souches de la même espèce.
- ▶ Elle n'est pas coûteuse et standardisée pour *P. aeruginosa* (pyocines).
- ▶ Cependant, cette méthode est relativement complexe et son pouvoir de discrimination n'est pas très marqué.

2.2. Analyse de la composition des esters d'acides gras méthylique (analyse FAME)

- ▶ On peut identifier les micro-organismes en analysant les profils des acides gras de cellules entières ou des membranes cellulaires à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse ou de la spectrométrie de masse.
- ▶ Les données sur le type, le contenu, la proportion et la variation du profil des acides gras servent à identifier et à caractériser le genre et l'espèce en les comparant aux profils d'acides gras d'organismes connus.

En conclusion

- ▶ L'expression des phénotypes microbiens est largement tributaire de variables environnementales (p. ex., pH de la culture, température, milieu sélectif versus non sélectif, épuisement des éléments nutritifs, présence d'agents stressants, etc.) et, par conséquent, peut introduire des incohérences dans le processus d'identification.
- ▶ Les méthodes phénotypiques ne sont acceptables que si les critères de réponse suffisent à identifier le micro-organisme avec un seuil de confiance élevé et à le distinguer des organismes phylogénétiquement et étroitement apparentés qui peuvent donner lieu à des problèmes d'innocuité.

- 
- ▶ En outre, l'applicabilité de la méthode est fondée sur la robustesse de l'information dans les bases de données de référence.
 - ▶ Par conséquent, les résultats des méthodes phénotypiques peuvent nécessiter des données supplémentaires provenant d'autres méthodes pour identifier avec précision un micro-organisme.