



Systematique microbienne:

**Identification et classification taxonomique des micro-organismes.
(Partie2)**

Pr Sari L

1. Méthodes moléculaires

- ▶ La mise au point de méthodes moléculaires a grandement amélioré la capacité de déceler, d'identifier et de classer les micro-organismes rapidement et aussi d'établir la relation taxonomique entre les genres et les espèces étroitement apparentées.
- ▶ L'identification à l'aide de méthodes moléculaires repose sur la comparaison de séquences d'acides nucléiques (ADN, ARN) ou de profils protéiques d'un micro-organisme avec les données documentés d'organismes connus.
- ▶ Les méthodes moléculaires sont considérées comme suffisamment sensibles pour permettre une détection à des concentrations faibles de micro-organismes viables ou non viables à la fois dans les cultures pures et dans les échantillons complexes (p. ex., terre, tourbe, eau, etc.).

1.1. Méthodes génotypiques

- ▶ Il s'agit notamment des méthodes telles que l'hybridation d'acide nucléique (le transfert de type Southern ou l'hybridation en phase soluble) et les technologies fondées sur l'amplification ou la réaction en chaîne de la polymérase (PCR).
- ▶ Cette dernière méthode repose sur des comparaisons de séquences de régions génomiques conservées comme l'ARNr 16S ou 18S, ou sur des comparaisons de polymorphismes de taille des fragments de restriction (RFLP), de polymorphismes de longueur de fragments amplifiés (AFLP) ou du contenu en pourcentage de G / C dans l'ADN génomique, avec les données correspondantes sur les organismes connus.



Une identification génotypique fiable nécessite des bases de données dotées d'informations exactes et complètes sur des séquences obtenues auprès d'un grand nombre de taxons.

Parmi les bases de données de séquences de gènes couramment utilisées, on compte :

- ▶ GenBank®
- ▶ Ribosomal Database Project (RDP)
- ▶ la collection européenne de données sur les séquences nucléotidiques (EMBL)
- ▶ et Universal Protein Resource (UniProt)

Certaines des restrictions associées aux méthodes génotypiques comprennent également :

- ▶ les difficultés à distinguer entre les espèces qui partagent des régions conservées de séquence identiques et/ou similaires,
- ▶ l'information limitée sur la qualité des données des séquences disponibles dans les bases de données publiques
- ▶ et la complexité de la nomenclature taxonomique dans son ensemble.



Il est important de valider les résultats des méthodes d'identification microbienne génotypiques avec des données provenant d'autres sources.

1.1.1. L'analyse plasmidique

- ▶ L'analyse plasmidique fut une des premières méthodes de biologie moléculaire appliquée en épidémiologie.
- ▶ Les plasmides sont des éléments génétiques extra-chromosomiques qui se reproduisent indépendamment du chromosome.
- ▶ La présence de plasmides est connue chez un grand nombre d'espèces bactériennes et peut varier d'une souche à l'autre.
- ▶ Le désavantage majeur de la méthode est la grande instabilité des plasmides ; ce phénomène est fréquent.
- ▶ En l'absence d'une pression sélective sur la souche, les cellules bactériennes ont tendance à perdre rapidement leurs plasmides.
- ▶ Ceci diminue la valeur de ce marqueur et rend la méthode utilisable pour des durées d'observation limitées seulement.
- ▶ De plus, quelques espèces bactériennes n'ont pas de plasmides connus et ne se prêtent donc pas à ce type d'analyse.

1.1.2. REA (restriction enzyme analysis)

- ▶ Le REA est une méthode universellement applicable à toutes les espèces bactériennes dont l'ADN peut être extrait.
- ▶ Cette méthode est simple et rapide.
- ▶ Cependant, la multitude des bandes obtenues rend l'interprétation des résultats très difficile.

1.1.3. RFLP (restriction fragment length polymorphism)

- ▶ Cette méthode permet de contourner l'inconvénient de la multitude des bandes du REA, puisqu'une sonde va mettre en évidence uniquement les fragments qui contiennent une séquence complémentaire à celle-ci.
- ▶ Cette sonde est un fragment d'ADN marqué, de séquence connue ou inconnue.
- ▶ L'opéron contenant les gènes ribosomiques est souvent utilisé comme sonde et la méthode est appelée « **ribotyping** ».
- ▶ L'avantage du ribotyping est que le typage d'espèces très différentes est possible avec la même sonde (par exemple l'opéron ribosomique de *E. coli*), car la séquence des gènes ribosomiques est hautement conservée.
- ▶ Le ribotyping a été validé pour un grand nombre d'espèces et un choix judicieux d'enzymes de restriction permet d'atteindre un pouvoir discriminant très élevé.

1.1.4. PFGE (pulsed field gel electrophoresis)

- ▶ Cette technique est une variation de l'électrophorèse en gel d'agarose qui permet l'analyse de fragments d'ADN beaucoup plus gros que ceux séparés par REA.
- ▶ Théoriquement, toutes les souches bactériennes (ainsi que d'autres micro-organismes, comme p. ex. les levures) peuvent être typées par cette méthode.
- ▶ La procédure technique et le matériel utilisé sont cependant plus compliqués que pour le REA, mais la méthode donne des profils de restriction hautement reproductibles, montrant typiquement des fragments distincts et bien nets.
- ▶ De plus, le PFGE s'est révélé être la méthode la plus discriminante lorsqu'elle était comparée à d'autres méthodes de typage génotypiques ou phénotypiques.
- ▶ Le **FIGE** (*field inversion gel electrophoresis*) ou le **CHEF** (*contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis*) sont des méthodes basées sur le même principe.

1.1.5. PCR (polymerase chain reaction)

- ▶ L'amplification de séquences particulières du génome par PCR est particulièrement intéressante pour des germes non cultivables ou à croissance difficile comme par exemple *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium* spp. ou *Helicobacter pylori*.
- ▶ Comme méthode de typage, elle peut être utilisée de deux façons :
 1. analyser la séquence amplifiée soit par électrophorèse après digestion, soit par séquençage ;
 2. amplifier arbitrairement des séquences : le RAPD (random amplified polymorphic DNA).

- 
- ▶ Cette dernière méthode semble très prometteuse car elle combine élégance, simplicité et rapidité.
 - ▶ Actuellement, de nombreux problèmes de standardisation sont rencontrés avec le RAPD (résultats différents en fonction du matériel utilisé) rendant cette méthode utilisable uniquement dans des laboratoires spécialisés.

1.1.6. L'analyse des isoenzymes ou MEE (multilocus enzyme electrophoresis)

- ▶ Cette technique se base sur les variations de la mobilité électrophorétique de certaines enzymes bactériennes (isoenzymes).
- ▶ Elle ne fait pas appel à des techniques de biologie moléculaire, mais peut être considérée comme une méthode génotypique.
- ▶ En effet, la variation de mobilité observée est due à une différence dans la séquence d'acides aminés de l'enzyme et donc reflète une différence dans la séquence des paires de bases du gène codant pour cette enzyme.

- 
- ▶ Son utilisation en épidémiologie se fait en analysant plusieurs enzymes pour chaque souche.
 - ▶ Les isoenzymes sont identifiées en comparant leur mobilité relative sur un gel après une coloration spécifique.
 - ▶ Les désavantages de cette méthode sont une procédure technique relativement lourde et difficile et un pouvoir de discrimination généralement moins élevé que le PFGE.
 - ▶ L'application de cette méthode en épidémiologie est donc limitée, mais c'est la seule à générer des données quantitatives utilisables pour l'étude de la génétique des populations bactériennes.

1.2. Méthodes protéiques

- ▶ Les méthodes sérologiques, comme le transfert de type Western, l'immunoprécipitation et le dosage immunoenzymatique avec antigène adsorbé (ELISA) utilisent des anticorps pour déceler des protéines précises qui sont uniques et/ou caractéristiques à un micro-organisme.
- ▶ L'applicabilité des méthodes sérologiques est dépendante de la disponibilité, de la sensibilité et de la spécificité des anticorps employés.
- ▶ Il existe des troussees commerciales pour l'immunodétection de plusieurs micro-organismes.
- ▶ Les méthodes protéiques comprennent aussi l'électrophorèse sur gel (SDS-PAGE, 2D gels, etc.) qui peuvent séparer les protéines cellulaires sur une matrice définie et qui permettent d'identifier les protéines microbiennes d'intérêt par la comparaison avec des micro-organismes aux profils protéiques connus.

2. Génomique

- ▶ Plus récemment, le profilage complet du transcriptome, du génome, du protéome ou du métabolome a été utilisé pour identifier et caractériser les organismes.
- ▶ Plusieurs technologies modernes comme les analyses de biopuces d'ADN ou de protéines, le profilage protéique par analyse spectrographique de masse, l'analyse spectrale par résonance magnétique nucléaire (RMN) et les plates-formes métabolomiques microbiennes *in silico* sont de plus en plus utilisées pour l'identification et la caractérisation des micro-organismes.
- ▶ Les connaissances en matière de sensibilité et de spécificité des outils génomiques et leurs applications dans l'identification microbienne évoluent rapidement.

- 
- ▶ Toutefois, des difficultés sont liées à la normalisation des méthodes génomiques (y compris l'optimisation des protocoles et des outils bio-informatiques pour l'annotation, l'interprétation fiable de données, etc.).
 - ▶ C'est pourquoi, la validation des données génomiques à l'aide d'autres méthodes est actuellement nécessaire pour valider l'identification et la classification taxonomique d'un ou de plusieurs microorganismes.

3. Classification et nomenclature taxonomiques

- ▶ L'identification taxonomique du ou des micro-organismes doit être fondée sur le système de classification taxonomique actuellement utilisé et reconnu mondialement.
- ▶ La description du ou des micro-organismes qui entrent dans la composition d'un produit et ses caractéristiques doivent correspondre aux caractéristiques décrites dans les ressources et/ou les références qui sont couramment utilisées par la communauté scientifique pour valider la classification taxonomique.

Ces documents peuvent notamment inclure :

- ▶ des manuels tels que Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
- ▶ The Prokaryotes
- ▶ Applied Microbial Systematics
- ▶ Principles of fungal taxonomy
- ▶ des ressources en ligne comme Catalogue of Life
- ▶ PubMed Taxonomy et UniProt Taxonomy des revues évaluées par des pairs.

- 
- ▶ Le nom taxonomique doit suivre le code de nomenclature officiellement reconnu par le Comité international sur la systématique des procaryotes (ICSP).
 - ▶ La classification et la nomenclature taxonomiques microbiennes, particulièrement pour les bactéries, sont constamment en changement, étant donné que les méthodes évoluent pour engendrer une information de plus en plus fiable afin d'identifier et de classer - ou de reclasser - le taxon actuel.
 - ▶ La vérification de concordance des ressources et des références aidera à valider la désignation et la classification taxonomiques actuelles d'un micro-organisme.

Conclusion

L'utilisation des techniques moléculaires a augmenté considérablement la puissance des méthodes de typage bactérien, permettant une approche beaucoup plus fine des enquêtes épidémiologiques.

Cependant, indépendamment de la méthode utilisée, l'application sans discernement d'une méthode de typage en dehors d'un contexte épidémiologique est généralement un gaspillage, une perte de temps, et peut amener des informations contradictoires !

Les résultats du typage doivent en effet confirmer ou infirmer, et non pas remplacer les hypothèses épidémiologiques.