

**Université de Bejaia**  
**Faculté des Science de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**

**Polycopié de cours**  
**Systematique des procaryotes**

**Licence en microbiologie**

**Dr. BENDJEDDOU Kamel**

# Sommaire

## Partie I : Taxonomie actérienne

I) Généralités.....	1
II) Définitions.....	1
III) Les différentes approches taxonomiques.....	2
III. 1) Taxonomie phénotypique.....	2
III. 1.1) Les étapes de la taxonomie phénotypique.....	2
a) La classification.....	2
b) La nomenclature.....	2
c) L'identification.....	4
III.1.2) Les démarche de l'identification phénotypique.....	4
a) Les tests d'orientation.....	4
b) L'identification de l'espèce.....	5
III.1. 3) Méthodes automatisées .....	6
a) Les galeries API.....	6
b) Limites spécifiques à l'utilisation des galeries.....	9
III.1.4) Limites de la taxonomie phénotypique.....	9
III.1.5) Méthodes immunologiques (sérotypage).....	10
III. 2) Taxonomie numérique.....	10
III. 3) Taxonomie génotypique (phylogénétique).....	10
III.3.1) Etude des ARN ribosomiques (ARNr).....	11
a) Principe de la technique de séquençage par PCR.....	13
b) Intérêt de la technique du séquençage de l'ADNr 16S.....	16
c) Limites de la technique du séquençage de l'ADNr 16S.....	17
III.3.2) Technique de l'hybridation ADN/ADN.....	17
➤ Définition de l'espèce bactérienne.....	18

## Partie II : Les Grands groupes Bactériens

Introduction.....	20
-------------------	----

### Chapitre I : Phylum des *Proteobacteria*

I) Classe des <i>Gammaproteobacteria</i> .....	23
I.1) Ordre des <i>Enterobacteriales</i> .....	23
I.1.1) Famille des <i>Enterobacteriaceae</i> .....	23

a) Genre : <i>Escherichia</i> .....	25
b) Genre : <i>Shigella</i> .....	26
c) Genre : <i>Klebsiella</i> .....	26
d) Genre : <i>Proteus</i> .....	27
e) Genre : <i>Salmonella</i> .....	28
f) Genre : <i>Yersinia</i> .....	29
I.2) Ordre des <i>Vibrionales</i> .....	30
I.2.1) Famille : <i>Vibrionaceae</i> .....	30
➤ Genre : <i>Vibrio</i> .....	30
I.3) Ordre des <i>Pseudomonadales</i> .....	31
I.3.1) Famille des <i>Pseudomonadaceae</i> .....	31
➤ Genre : <i>Pseudomonas</i> .....	31
II) Classe des <i>Betaproteobacteria</i> .....	32
II.1) Ordre : <i>Neisseriales</i> .....	32
II.1.1) Famille : <i>Neisseriaceae</i> .....	32
➤ Genre : <i>Neisseria</i> .....	32

## **Chapitre II: Phylum des *Firmicutes***

I.) Classe des <i>Bacilli</i> .....	33
I.1) Ordre des <i>Lactobacillales</i> .....	33
I.1.1) Famille des <i>Streptococcaceae</i> .....	33
a.1) Genre : <i>Streptococcus</i> .....	33
a.2) Classification des <i>Streptococcus</i> .....	34
I.1.2) Famille des <i>Leuconostocaceae</i> .....	36
➤ Genre : <i>Leuconostoc</i> .....	36
I.1.3) Famille : <i>Lactobacillaceae</i> .....	36
a) Genre : <i>Lactobacillus</i> .....	36
b) Genre : <i>Pediococcus</i> .....	37
I.2) Ordre des <i>Caryophanales</i> .....	37
I.2.1) Famille : <i>Staphylococcaceae</i> .....	37
➤ Genre <i>Staphylococcus</i> .....	37
I.2.2) Famille des <i>Listeriaceae</i> .....	39
➤ Genre <i>Listeria</i> .....	39
I.2.3) Famille : <i>Bacillaceae</i> .....	39

➤ Genre <i>Bacillus</i> .....	39
II) Classe des <i>Clostridia</i> .....	41
II.1) Ordre des <i>Eubacteriales</i> .....	41
II.1.1) Famille : <i>Clostridiaceae</i> .....	41
➤ Genre : <i>Clostridium</i> .....	41
III) Classe des Negativicutes.....	42

### **Chapitre III: Phylum des *Actinobacteria***

I) Classe des <i>Actinobacteria</i> .....	43
I.1) Ordre des <i>Micrococcales</i> .....	43
I.1.1) Famille des <i>Micrococcaceae</i> .....	43
➤ Genre : <i>Micrococcus</i> .....	43
I.2) Ordre <i>Bifidobacteriales</i> .....	44
I.2.1) Famille : <i>Bifidobacteriaceae</i> .....	44
➤ Genre : <i>Bifidobacterium</i> .....	44
I.3) Ordre des <i>Streptomycetales</i> .....	44
I.3.1) Famille <i>Streptomycetaceae</i> .....	44
➤ Genre <i>Streptomyces</i> .....	44
I.4) Ordre des <i>Corynebacteriales</i> .....	45
I.4.1) Famille : <i>Nocardiaceae</i> .....	45
➤ Genre : <i>Nocardia</i> .....	45
I.4.2) Famille : <i>Mycobacteriaceae</i> .....	45
➤ Genre : <i>Mycobacterium</i> .....	45

### **Chapitre IV: Phylum des *Tenericutes***

I) Classe : <i>Mollicutes</i> .....	47
➤ Genre : <i>Mycoplasma</i> .....	47
➤ Genre : <i>Ureaplasma</i> .....	47
I.2) Ordre des <i>Acholeplasmatales</i> .....	48
I.2.1) Famille des <i>Acholeplasmataceae</i> .....	48

## Préambule

Cet ouvrage est un polycopié de cours de systématique des procaryotes destiné aux étudiants de 3<sup>ème</sup> année en Licence de Microbiologie (SNV), il est rédigé selon le programme officiel du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique. Vu que la taxonomie bactérienne est une discipline compliquée et assez difficile à comprendre, le document est rédigé en utilisant un langage scientifique simplifié afin de permettre aux étudiants de mieux comprendre le cours, sans oublier de l'approfondir et l'actualiser. De ce fait, ce polycopié présente un support de cours important pour les étudiants dans le domaine de la taxonomie bactérienne. Il s'articule autour de deux parties :

- La première partie est consacrée aux trois disciplines de la taxonomie bactérienne à savoir la classification, la nomenclature et l'identification bactérienne.
- La deuxième partie est consacrée aux grands groupes bactériens selon le Bergey's manual of systematic bacteriology. Ces groupes sont choisis suivant leur intérêt médical, vétérinaire, industriel et/ou environnemental. Cette partie est subdivisée en quatre chapitres :
  - Chapitre 1 : *Phylum des Proteobacteria*
  - Chapitre 2 : *Phylum des Firmicutes*
  - Chapitre 3 : *Phylum des Actinobacteria*
  - Chapitre 4 : *Phylum des Tenericutes*

# **Partie I : Taxonomie bactérienne**

## I) Généralités

Une espèce d'un être vivant supérieure (animal ou végétal) est définie comme étant un ensemble d'individus reconnus par leurs caractères morphologiques et capables de se reproduire entre eux en générant un individu fertile. Cette définition n'est pas applicable aux bactéries du fait que les caractères morphologiques utilisés pour définir une espèce eucaryote, ne sont pas fiables parce que les bactéries sont, morphologiquement, très simples, par conséquent l'élaboration d'une définition originale et spécifique aux bactéries est nécessaire. En microbiologie, une espèce bactérienne est constituée d'une souche type, ayant les caractères les plus stables de l'espèce, et un ensemble de souches présentant des caractères très proches de la souche type. Afin d'éviter les divergences entre les auteurs sur les critères de choix pour donner une définition d'une espèce bactérienne, des comités internationaux sont constitués pour déterminer ces critères et proposer une définition cohérente d'une espèce bactérienne. Parmi ces comités on trouve le comité international sur la systématique des procaryotes (International Committee on Systematics of Prokaryotes ou ICSP), ce comité possède une revue spécialisée dans le domaine de la taxonomie bactérienne, il s'agit d'International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology ou IJSEM. Ce comité s'occupe de tout ce qui concerne la taxonomie bactérienne, et toute classification n'est valable sauf si elle est avalisée par ce comité et publiée dans son revue.

## II) Définitions :

Avant d'entamer le domaine de la taxonomie bactérienne, il est important de donner les définitions suivantes :

- **Espèce** : vu les difficultés suscitées pour établir une définition claire d'une espèce bactérienne, on définit pour le moment une espèce bactérienne comme étant un ensemble de souche ayant des caractères phénotypique et génétique en commun. La définition précise de l'espèce bactérienne sera donnée plus tard.
- **Souche** : une souche bactérienne est un ensemble de bactéries descendant de la même cellule bactérienne, autrement dit c'est un isolat d'une culture pure. Au sein de la même espèce, les souches peuvent présenter des caractères légèrement différents. Ces caractères peuvent être des caractéristiques biochimiques, physiologiques, antigéniques ou des facteurs de virulence.
- **Taxonomie** : c'est la science qui étudie la classification, la nomenclature et l'identification des microorganismes. Elle permet de classer les microorganismes selon leurs ressemblances en groupe appelés « taxons ». Les taxons sont de grandeurs très différentes.
- **Classification** : c'est le regroupement des microorganismes en groupes ou taxons selon leurs caractéristiques phénotypiques ou génotypiques.
- **Identification** : c'est l'attribution d'un individu inconnu à un taxon connu. La souche inconnue est comparée à des espèces déjà décrites (souches types) et le nom de l'espèce la plus similaire est proposé.

### **III) Les différentes approches taxonomiques**

Les techniques de taxonomie bactérienne ont évolué en fonction du développement des méthodes biochimiques et moléculaires ainsi que l'invention de l'outil informatique, donc on distingue quatre grandes périodes au cours desquelles ont été utilisées une taxonomie phénotypique, une taxonomie numérique, une taxonomie phylogénétique et une taxonomie mixte et consensuelle.

#### **III. 1) Taxonomie phénotypique**

##### **III. 1.1) Les étapes de la taxonomie phénotypique**

La taxonomie comporte trois étapes principales : la classification, la nomenclature et l'identification

###### **a) La classification**

La classification est la première étape de la taxonomie, jusqu'au début des années 1960, toute la taxonomie bactérienne reposait sur la classification phénotypique. Cette classification utilise des caractères basés sur le phénotype comme la morphologie, les caractères culturels, les caractères biochimiques, le pouvoir pathogène...etc. Ici, l'identification d'une espèce repose sur la comparaison des divers caractères phénotypiques de la souche à étudier vis à vis de ceux d'une espèce de référence.

Les tests phénotypiques les plus importants sont :

- Observation microscopique : elle permet de déterminer la morphologie (bacille, coque...etc.), la mobilité, la formation de spore...etc.
- Colorations : comme la coloration de Gram, Ziel-Nielsen, spore, capsule...etc.
- Caractères culturels : comme la croissance en aérobiose ou en anaérobiose, la croissance sur milieux sélectifs, le type d'hémolyse...etc.
- Caractères biochimiques : comme le test de l'oxydase, la production d'indole, la production d'H<sub>2</sub>S, la production d'enzymes (nitrate réductase, uréase, gélatinase, lipase...etc.), fermentations des sucres (glucose, lactose, mannitol...etc.)
- Composition chimique de la paroi et/ou la membrane cytoplasmique (chimiotaxonomie) : peptidoglycane, acides gras, acide mycolique.

Après la détermination des caractéristiques phénotypiques d'une population bactérienne par les techniques suscitées, les bactéries de cette population seront regroupés en groupes appelés « taxons ».

###### **b) La nomenclature**

La nomenclature est la deuxième étape de la taxonomie, c'est l'ensemble des règles permettant de donner un nom à chaque taxon obtenu par la classification. Elle a pour but d'unifier le langage scientifique international en donnant aux taxons des noms identiques permettant de les connaître par

n'importe quel microbiologiste du monde, la nomenclature bactérienne est réglementée par le code international de la nomenclature bactérienne. Les noms scientifiques des bactéries sont issus du grec et/ou du latin ou une autre langue à laquelle des préfixes ou suffixes latins sont ajoutés. Certains noms rappellent une maladie ou une lésion, d'autres un scientifique, d'autres encore un métabolisme ou un lieu géographique.

**Exemple :**

- *Streptococcus* : du latin *streptos* (chaîne) et *coccus* (coque)
- *Escherichia* : du mot Escherich (un microbiologiste allemand)

Les principales règles du code international de la nomenclature bactérienne sont :

- Le nom d'un taxon ne doit contenir que les 26 lettres de l'alphabet latin et aucune autre lettre n'est tolérée (comme : á, à, â, ä, ã, é, è, ê, ë, î, ï, ñ, ó, ò, ô, ö, õ, ú, ù, û, ü, ø, æ). Par exemple, on doit écrire *Bacteroides* et non *Bacteröides*
- Le nom ne doit pas contenir de trait d'union, par exemple on doit écrire *Nocardia otitidiscaviarum* et non *Nocardia otitidis-caviarum*.
- Le nom d'une espèce est binomial (composé de deux mots), le premier mot est le nom du genre, il doit commencer avec une majuscule, le deuxième mot donne un caractère discriminant d'une espèce donnée permettant de la distinguer des autres espèces du même genre, ce mot s'écrit en minuscule. Les deux mots du nom de l'espèce doivent être écrits en italique (ou bien sont soulignés).
- Le nom de la famille se termine par « *-aceae* » et celui de celui de l'ordre par « *-ales* »
- La sous-espèce est notée subsp. (subspecies) suivie d'un nom latin en italique (ou souligné).
  - \* **Remarque** : dans certains ouvrages et surtout sur les articles, la sous-espèce est notée *ssp.* qui est une abréviation de *subsp.*, cette écriture n'est pas conforme au code international de la nomenclature bactérienne.
- L'appartenance d'une souche isolée au laboratoire à un genre, sans précision de l'espèce, est notée du nom du genre suivi de *sp.* (de l'anglais *specie* qui veut dire espèce) tant que cet isolat n'est pas identifié à une espèce.
- Lorsque l'on veut désigner toutes les espèces d'un genre, pour souligner un caractère biochimique ou pathologique commun, le nom du genre est suivi de *spp.*, par exemple au lieu d'écrire : toutes les espèces du genre *Streptococcus* sont catalase négative, on peut écrire : les *Streptococcus spp.* sont catalase négative.
- Une espèce ou une sous-espèce peut contenir des souches présentant des caractéristiques particulières correspondant à une maladie, une origine géographique ou un caractère biologique ou sérologique...etc, comme les biovars (variétés biologiques), les sérovars (variétés sérologique), ou les pathovars (variétés pathologiques). Ces différents -vars sont décrites par des numéros, des lettres et/ou des noms. Ces noms ne correspondent pas à des noms scientifiques, ils s'écrivent donc avec une majuscule au début du mot et le mot ne doit pas être en italique.

### **Exemple**

- *Salmonella* Typhi, le mot Typhi est écrit en majuscule est sans italique parce que Typhi est serovars de l'espèce *Salmonella enterica*
- La meme chose pour *Pasteurella multocida subsp. Multocida* D (serovars D).

### **c) L'identification**

L'identification bactérienne est la science qui permet de connaître une souche bactérienne inconnue et l'affilier à l'un des taxons connus établis par la classification et la nomenclature. Les méthodes d'identification choisies doivent être rapides et informatives afin d'assurer une identification rapide est fiable. La démarche l'identification se fait en 2 étapes : les tests d'orientation et l'identification de l'espèce.

### **III.1.2) Les démarche de l'identification phénotypique**

#### **a) Les tests d'orientation**

C'est un ensemble de tests préliminaires qui guident le taxonomiste vers un taxon connus qui est souvent une famille ou un genre (Tableau I). Il est nécessaire au cours de cette étape de connaître les caractères généraux des bactéries comme l'aspect et la couleur des colonies sur des milieux de culture spécifique, le Gram et la forme des bactéries, leur mobilité et certains de leurs caractères biochimiques spécifiques comme l'oxydase et la catalase.

**Remarque :** Il est intéressant de noter que c'est possible d'identifier certaines espèces bactériennes avec un seul test d'orientation, ce test est appelé test unitaire.

Exemple de tests unitaires :

- Colonies violettes avec un reflet métallique verdâtre sur milieu EMB : *Escherichia coli*
- Présence d'une coagulase : *Staphylococcus aureus*
- Hydrolyse de l'esculine : *Listeria monocytogenes*
- Hydrolyse de l'hippurate : *Campylobacter jejuni*

**Tableau I :** Caractères d'orientation des principaux bacilles Gram - et coques Gram +  
(D'après <http://droguet-sebastien.e-monsite.com>)

	Forme	Gram	Exigence nutritive	Oxydase	Catalase	Type respiratoire	Voie de dégradation du glucose
Genre <i>Acinetobacter</i>	CB	-	-	-	+	AS	oxydative +/-
Genre <i>Alcaligenes</i>	B	-	-	+	+	AS	inerte
Genre <i>Pseudomonas</i>	B	-	-	+	+	AS	oxydative
Genre <i>Vibrio</i>	B	-	-	+	+	AA	fermentatif
Famille des <i>Enterobacteriaceae</i>	B	-	-	-	+	AA	fermentatif
Genre <i>Enterococcus</i>	C	+	-	-	-	AA	fermentatif
Genre <i>Streptococcus</i>	C	+	+	-	-	AA	fermentatif
Genre <i>Staphylococcus</i>	C	+	-	-	+	AA	fermentatif
Genre <i>Micrococcus</i>	C	+	-	-	+	AS	oxydative

Légendes : B = bacilles

C = coques

CB = coccobacilles

AS = aérobie strict

AA = aéro-anaérobie

ANS = anaérobie-strict

## b) L'identification de l'espèce

Elle est réalisée sur un plus grand nombre de caractères, ces caractères sont bien standardisés et dépendent du groupe bactérien dans lequel le diagnostic a été orienté, cela montre le rôle important des tests d'orientation car une erreur commise au cours de ces tests aboutit à une identification erronée. Les tests d'identification nécessitent certaines mesures de précaution comme une culture pure et une période d'incubation suffisante pour permettre la consommation de substrats. Une fois les caractères phénotypiques sont déterminés, on se réfère à des tableaux d'identification pour identifier l'espèce bactérienne étudiée (Tableau II).

**Tableau II** : Principaux caractères d'identification des espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*

(Sources : <http://www.techmicrobio.eu/index.php/component/content/article?id=244:tableaus-identification-eb>)

	Mobilité	Lactose	ONPG	ADH	LDC	ODC	Citrate	H <sub>2</sub> S	Uréase	TDA	Indole	VP	Gélatinase	Mannitol	Saccharose	RM	ADNase
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	(-)	(+)	V	-	-	-	-	+	-	-	+	V	+	-
<i>Shigella sauf sonnei</i>	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	V	-	-	(+)	-	+	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	(+)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Salmonella (majorité)</i>	+	-	-	(+)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Salmonella typhi</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	+	-	-	(-)	-	+	-	(-)	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	V	+	V	-	(-)	+	(+)	-	-	(-)	-	-	+	V	+	-
<i>Citrobacter diversus</i>	+	V	+	V	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	V	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	(-)	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	(+)	-	+	+	-	+	+	(-)	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	(-)	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	(+)	+	+	-	+	+	-	V	-	-	+	-	+	+	(-)	-
<i>Hafnia alvei</i>	(+)	(-)	(+)	(-)	+	+	(-)	-	-	-	-	(+)	-	+	(-)	V	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	(-)	-	-	+	(+)	+	+	(-)	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	-	-	-	+	V	+	+	+	-	V	(+)	-	(-)	+	V
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	-	-	-	-	(-)	+	+	+	+	-	(+)	-	+	+	(+)
<i>Providencia rettgeri</i>	(+)	(-)	(-)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	(-)	(+)	-
<i>Providencia stuartii</i>	(+)	-	(-)	-	-	-	(+)	-	V	+	+	-	-	(-)	V	+	(-)
<i>Providencia alcalifaciens</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	(-)	+	-
<i>Morganella morganii</i>	+	-	(-)	-	-	+	-	(-)	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	(-)	+	-	-	+	-	-	(+)	-	V	-	-	+	+	+	(-)
<i>Yersinia pestis</i>	-	-	V	-	-	-	-	-	(-)	-	-	-	-	+	-	(+)	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-	(+)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-

### III.1. 3) Méthodes automatisées – galeries d'identification

Actuellement on utilise des systèmes de micro-tests prêts à l'emploi appelés "galerie" permettant la réalisation des tests biochimiques d'identification de l'espèce, ces galeries permettent une identification facile et fiable. Une galerie contient des substrats et des milieux déshydratés, la suspension bactérienne répartie dans les tubes dissout les substrats. Après incubation, les métabolites produits sont mis en évidence par des réactions colorées (spontanées ou après addition de réactifs).

Parmi les galeries d'identification les plus importantes on trouve :

- a) **Les galeries API** : les galeries API utilisent le même principe des techniques biochimiques conventionnelles d'identification, elles se présentent sous forme de cupules contenant des substrats lyophilisés nécessaires aux différents tests biochimiques, ces substrats varient selon la galerie, il existe plusieurs galeries en fonction des différents groupes bactériens (Tableau III), l'inoculum et le milieu de suspension varient selon le type de galerie.

**Tableau III :** Quelques exemples de galeries API fabriquées par BioMérieux

Galerie	Utilisation
API 20 E	Entérobacteries
RapiD 20 E	Identification rapide des Enterobacteries en 4heures
API 20 EC	Coliformes
API STAPH	Identification des Staphylocoques
API 20 STREP	Surtout <i>S. viridans</i>
API 20 A	Germes anaérobie
API 20 C	Candida
NH	<i>Neisseria</i> et <i>Haemophilus</i>

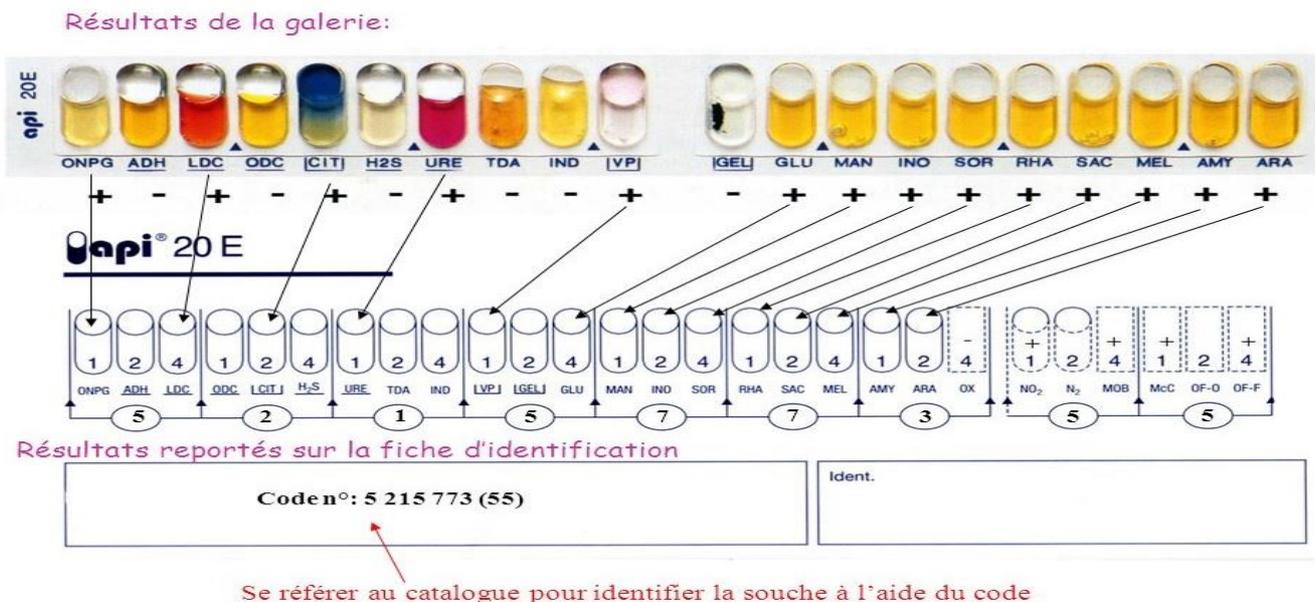
La galerie est inoculée et interprétée selon les recommandations du fabricant (Tableau IV).

**Tableau IV :** Lecture de la galerie API 20E (Bio-Mérieux).

Tests	substrats	Réaction /enzyme	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phényl-galactopyranoside	$\beta$ -galactosidase	incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/Orange
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orange
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge /Orange
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle /Bleu	Bleu-vert/Bleu
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production de H <sub>2</sub> S	Incolore/grisâtre	Dépôt noire
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/Orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA	
			Jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	Kovacs	
			Incolore/Jaune	Rose/anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoine	VP <sub>1</sub> +VP <sub>2</sub> /10 min	
			Incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion des pigments noirs
GLU	Glucose	Fermentation/Oxydation	Bleu/Bleu-vert	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/Oxydation	Bleu/Bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/Oxydation	Bleu/Bleu-vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/Oxydation	Bleu/Bleu-vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/Oxydation	Bleu/Bleu-vert	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/Oxydation	Bleu/Bleu-vert	Jaune

<b>MEL</b>	Melibiose	Fermentation/Oxydation	Bleu/Bleu-vert	Jaune
<b>AMY</b>	Amygdaline	Fermentation/Oxydation	Bleu/Bleu-vert	Jaune
<b>ARA</b>	Arabinose	Fermentation/Oxydation	Bleu/Bleu-vert	Jaune
<b>OX</b>	Sur papier filtre	Cytochrome-oxydase	OX/1 à 2 min	
			Incolore	Violet
<b>NO<sub>3</sub>-NO<sub>2</sub></b>	Tube GLU	Production de NO <sub>2</sub> Réduction au stade N <sub>2</sub>	NIT <sub>1</sub> +NIT <sub>2</sub> /2-3mn	
			Jaune	Rouge
			Poudre de Zink	
			Rouge	Jaune
<b>MOB</b>	Microscope	Mobilité	Immobile	Mobile
<b>MAC</b>	Milieu de Mac Conkey	Culture sur	Absence	Présence
<b>O/F</b>	Glucose	Fermentation : sous huile Oxydation : à l'air	Vert Vert	Jaune Jaune

Les résultats des tests positifs et négatifs sont utilisés pour obtenir un code d'identification, ce dernier est obtenu comme suit : Les tests sont regroupés de gauche à droite en triplet (3 tests), pour chaque triplet, les tests négatifs sont codés 0 et les tests positifs sont codés 1 pour le premier test, 2 pour le second, 4 pour le troisième. Les 3 chiffres du triplet sont additionnés et les sommes de chaque triplet lu de gauche à droite forment un code d'au moins 7 chiffres qui correspond au profil biochimique du micro-organisme étudié (Figure 1). Le code obtenu utilisé pour identifier l'espèce grâce à un catalogue ou un CD fournis avec la galerie ou en utilisant le site web du fabricant.



**Figure 1** : Obtention du code de la galerie API20E (Source : <https://slideplayer.fr/slide/512760/>)

En plus de l'identification de l'espèce, la technique des galeries donne aussi le pourcentage de fiabilité de l'identification (probabilité d'appartenance à une espèce), on considère généralement les seuils suivants :

- >99,9% excellente identification
- >99% très bonne identification
- >90% bonne identification
- >80% identification acceptable
- <80% identification inacceptable.

#### **b) Limites spécifiques à l'utilisation des galeries**

Les méthodes phénotypiques sont fiables et performantes pour l'identification d'un grand nombre d'espèces, cependant ces performances sont limitées pour l'identification de certaines souches. D'une manière générale, le taux d'erreur des galeries varie entre 5 et 20% selon les galeries considérées, comprenant les identifications incorrectes (1-15%) ou les identifications non concluantes (3-5%). Les systèmes d'identification commercialisés sont des systèmes fermés avec des bases de données limitées, leur mise à jour, si elle est possible, ne peut se faire que par le fabricant de la galerie. Les nouvelles espèces ne sont donc pas prises en compte, une espèce absente dans la base de données des galeries d'identification ne sera pas reconnue mais un ou plusieurs noms seront proposés.

#### **III.1.4) Limites de la taxonomie phénotypique**

Malgré l'importance des caractères phénotypiques pour l'identification des microorganismes mais ils ne sont pas adaptés à certains types de bactéries comme les bactéries ayant une croissance lente ou difficile (*Chlamydiae*, *Rickettsiae*) ou aux germes non cultivables (beaucoup d'espèces du sol et du microbiote intestinal humain et animal). De plus, certains facteurs comme le climat et l'origine du prélèvement (clinique, vétérinaire ou environnementale) peuvent modifier les propriétés biochimiques et/ou physiologiques des souches bactériennes. D'autres facteurs peuvent aussi influencer sur l'identification phénotypique des bactéries comme la variation du phénotype par la présence ou l'absence d'un ou plusieurs plasmides codant pour des caractères biochimiques ou culturels (résistance à certains antibiotiques), la variation de la taille de l'inoculum, la durée d'incubation, la conservation des souches (perte de certaines caractéristiques à cause d'une longue conservation), la température d'incubation et la composition du milieu de culture.

### III.1.5) Méthodes immunologiques (sérotypage)

Elles sont basées sur la réaction d'un anticorps spécifique vis à vis d'un antigène du corps bactérien, d'un antigène soluble ou d'une toxine. Elles ont l'avantage d'être rapides et spécifiques. Elles sont utilisées pour identifier les bactéries à croissance difficile ou lente, détecter une bactérie dans un mélange complexe ou mettre en évidence un ou plusieurs antigènes solubles.

#### Exemple :

- Immunofluorescence : Détection directe de *Chlamydiae trachomatis*.
- Agglutination : Recherche d'antigènes soluble dans le LCR (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*...etc.).
- Séro-inhibition : Recherche de l'ADNase de *Staphylococcus aureus*.

### III. 2) Taxonomie numérique

Cette approche taxonomique a été proposée en 1957, elle est devenue possible grâce à l'invention de l'outil informatique d'où son nom taxonomie numérique. La méthode consiste à étudier, pour chaque souche, tous les caractères possibles, il s'agit de centaines de caractères morphologiques, biochimiques, culturels, structuraux...etc. Ces caractères sont ensuite 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 afin d'évaluer la ressemblance entre les souches en calculant un indice numérique (coefficient de similitude ou distance taxonomique), ces calculs sont effectués avec un ordinateur, les bactéries étudiées sont ensuite regroupées en taxons en se basant sur des pourcentages de similitude fixés par le taxonomiste. L'avantage de cette approche est la possibilité d'étudier un grand nombre de caractères à la fois (jusqu'à 300 tests dans certaines études).

### III. 3) Taxonomie génotypique (phylogénétique)

Les techniques phénotypiques présentent toutes des limites, donc les techniques moléculaires présentent une alternative intéressante et complémentaire aux techniques phénotypiques pour la taxonomie bactérienne. Ces méthodes reposent sur la mise en évidence de séquences nucléotidiques spécifiques à partir de prélèvements cliniques ou de colonies isolées sur milieux de culture, elles rassemblent des méthodes incluant une amplification de la cible par PCR (séquençage de l'ADNr 16S) ou sans amplification de la cible (utilisation des sondes nucléiques marquées). Dans l'idée d'une identification au plus vite d'un germe pathogène, ces méthodes sont rapides, fiables et précises. Ces techniques sont incontournables pour l'identification de certaines bactéries pathogènes de croissance lente, difficile ou non cultivable comme pour *Bordetella pertussis*, *Chlamydiae trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* ou *Mycoplasma pneumoniae*. La recherche du

génomique de bactéries difficilement cultivable n'est cependant pas systématique et se fait pour certains pathogènes sur demande motivée du clinicien.

Cette approche taxonomique a été proposée en 1936 mais les outils nécessaires au développement d'une telle taxonomie n'étaient pas disponibles et il fallut attendre 1983 pour qu'une taxonomie phylogénétique commence à se mettre en place.

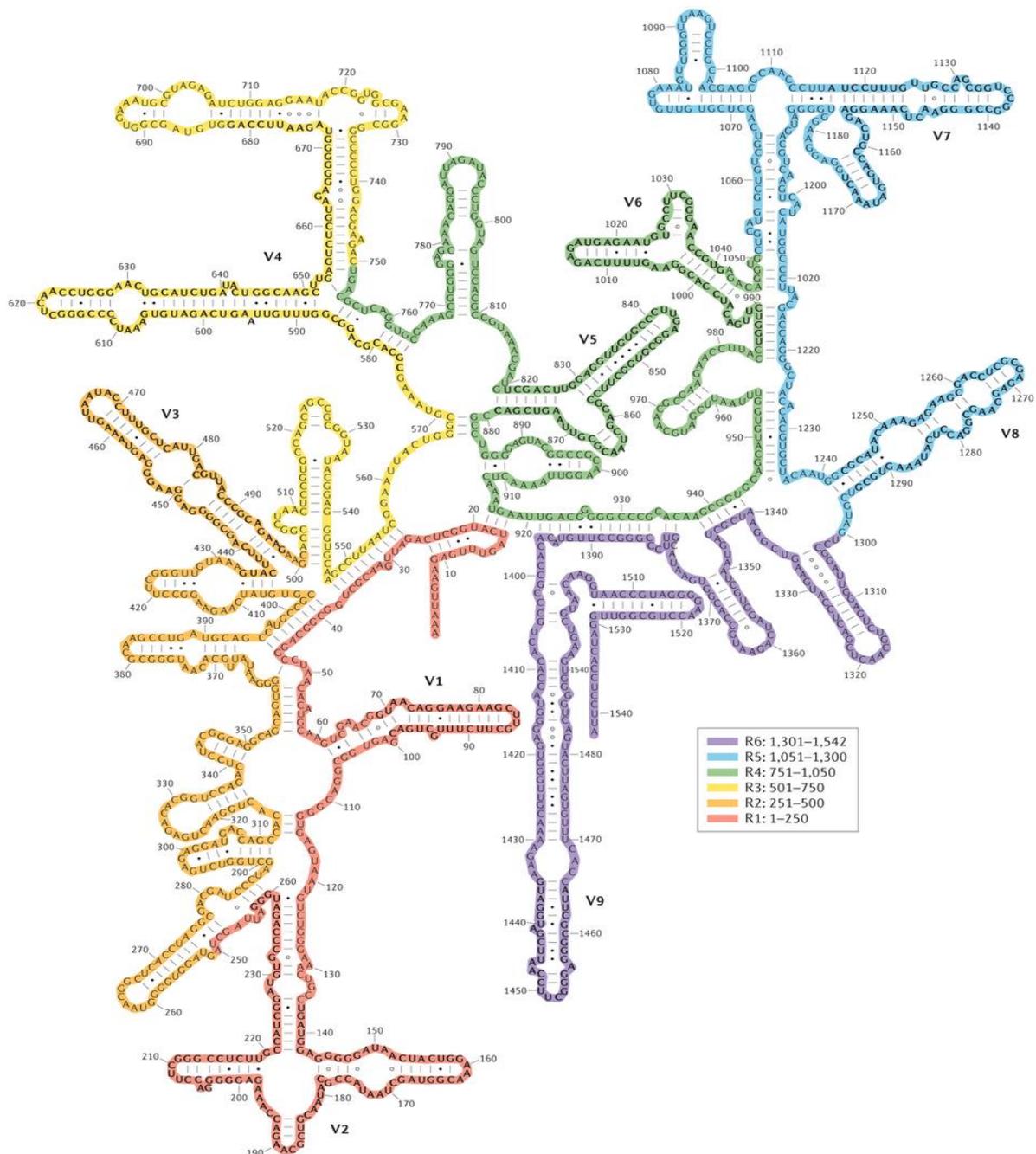
### **III.3.1) Etude des ARN ribosomiques (ARNr)**

Le but de cette taxonomie est de réaliser une classification universelle et évolutionniste de tous les êtres vivants, le principe de base consiste à comparer des gènes homologues présents chez tous les êtres vivants descendant d'un ancêtre commun et ayant conservés une fonction identique au cours du temps. Le choix des séquences à comparer a posé un problème car il était difficile de trouver une molécule qui soit présente et homologue chez tous les organismes vivants. En effet, pour comparer des organismes très éloignés il faut utiliser des séquences qui restent sensiblement conservées durant des centaines de millions d'années, tandis que la comparaison d'organismes proches requiert l'étude de séquences où des mutations se seront accumulées en quelques millions d'années. Les ARNr (ARN ribosomiques) ont été choisis en taxonomie pour quatre raisons principales :

- Ils sont présents dans toutes les cellules ce qui permet des comparaisons entre procaryotes et eucaryotes.
- Ils ont une structure bien conservée
- Il existe des portions d'ARNr dont la séquence est identique chez tous les êtres vivants.
- Ils sont abondants dans la cellule et facile à purifier.

Les ARNr sont associés à des protéines pour former les ribosomes, ces derniers sont composés de deux sous unités. Un ribosome bactérien contient une sous unité 30S et une sous unité 50S, la sous unité 30S 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 1500 nucléotides et l'ARNr 23S comprend environ 2900 nucléotides. Tous les ARNr sont monocaténares sauf dans quelques régions où se forment des boucles par appariement de bases complémentaires situées sur la même chaîne (Figure 2). Les ARNr sont utilisés pour analyser les relations taxonomiques des bactéries au niveau de l'espèce et à des taxons plus élevés, l'ARNr 16S est plus facile à analyser que l'ARNr 23S et plus riche en information que l'ARNr 5S, c'est pour cette raison qu'il est le plus utilisé dans la taxonomie bactérienne. Il contient des régions conservées (constantes) et identiques pour toutes les bactéries et des régions variables, les régions variables sont très importantes car c'est grâce à elles que les bactéries sont classées en taxons, à chaque taxon correspondra une séquence particulière au niveau de ces régions.

Les régions conservées étant identiques chez toutes les bactéries, sont utilisés pour construire des amorces universelles pour amplifier l'ARN 16S par PCR. Vu les difficultés techniques liées à l'utilisation de l'ARN 16S, en particulier son association aux protéines ribosomales et sa sensibilité aux ARNase, actuellement on utilise le gène qui code pour l'ARN 16S, c'est l'ADNr 16S.



### a) Principe de la technique de séquençage par PCR

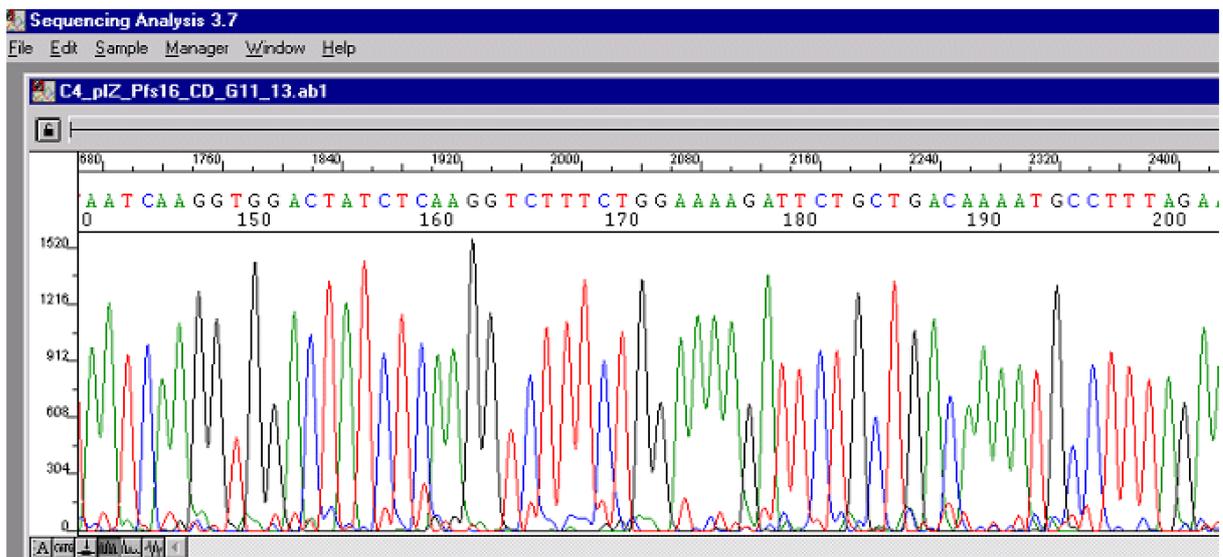
Le principe de cette technique est basé sur l'utilisation d'une amorce universelle (15 à 25 nucléotides) commune à toutes les bactéries, cette amorce est complémentaire à une séquence conservée de l'ADNr 16S, et nécessaire à l'accrochage de l'ADN polymérase.

**Tableau 2 :** Quelques exemples d'amorces universelles utilisées pour l'amplification et le séquençage de l'ADNr 16S (D'après : Renvoisé, 2012)

<b>Amorces d'amplification pour le 16S long* (5' =&gt; 3')</b>	
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT
<b>Amorces de séquençage pour le 16S long (5' =&gt; 3')</b>	
536F	CAGCAGCCGCGGTAATAC
536R	GTATTACCGCGGCTGCTG
800f	ATTAGATACCCTGGTAG
800r	CTACCAGGGTATCTAAT
1050f	TGTCGTCAGCTCGTG
1050r	CACGAGCTGACGACA

<b>Amorces d'amplification pour le 16S court† (5' =&gt; 3')</b>	
536F	CAGCAGCCGCGGTAATAC
rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT
<b>Amorces de séquençage pour le 16S court (5' =&gt; 3')</b>	
536F	CAGCAGCCGCGGTAATAC
800f	ATTAGATACCCTGGTAG
800r	CTACCAGGGTATCTAAT
1050f	TGTCGTCAGCTCGTG

La première phase est la synthèse d'ADN complémentaire au brin matrice par l'ADN polymérase (à partir de l'amorce), par l'ajout de bases nucléotidiques (dNTP : dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Afin de faciliter le séquençage de l'ADN 16S, des nucléotides légèrement différents (ddNTP : ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) sont utilisés en petites quantités, donc dans le milieu réactionnel, les dNTP sont en grande quantité par rapport aux ddNTP, lorsque l'ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, la synthèse du brin s'arrête. L'incorporation aléatoire de ddNTP permet d'obtenir des fragments d'ADN de taille variable (longueurs différentes), les ddNTP incorporés sont marqués par 4 fluorochromes différents. Après amplification de l'ADN 16S par PCR, il sera séquençé par un séquenceur automatique d'ADN, le séquenceur sépare les fragments d'ADN selon leur taille par chromatographie, les séquenceurs actuels détectent la fluorescence des 4 nucléotides à partir de la même colonne, ensuite les fragments d'ADN sont séquençés par électrophorèse capillaire en se basant sur la technique de Singer, le résultat du séquençage est donné sous forme d'un électrophorégramme (fig. 3), ce dernier est utilisé pour obtenir la séquence de l'ADNr 16S de la souche à étudier.



**Fig. 3 :** Eemple d'un électrophorégramme. (Source :[https://www.researchgate.net/figure/Electrophoregramme-du-clone-C4-de-pfs16CHis-avec-lamorce-directe\\_fig9\\_279537440](https://www.researchgate.net/figure/Electrophoregramme-du-clone-C4-de-pfs16CHis-avec-lamorce-directe_fig9_279537440))

L'étape suivante consiste à effectuer l'alignement des séquences obtenues et les comparées à des séquences déposées dans des banques de données disponibles sur internet, le site le plus connu permettant de réaliser des comparaisons de séquences d'ADN ou d'ARN est celui du site NCBI, il a un outil de comparaison de séquences qui s'appelle BLAST (Basic

Local Alignment Search Tool), il est disponible sur le site internet suivant: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) (Fig. 4).

The image shows the NCBI BLAST web interface. At the top, there are logos for NIH and NCBI. The main heading is 'BLAST >> blastn suite'. Below this, it says 'Standard Nucleotide BLAST'. There are tabs for 'blastn', 'blastp', 'blastx', 'tblastn', and 'tblastx'. The 'blastn' tab is selected. The main section is 'Enter Query Sequence'. It has a text area with a DNA sequence: 'aattgaagag ttgatcatg gctcagattg aacgctggcg qcaggcctaa cacatqcaag taacaggaag cagcttgctg ctttctgagc gattggcggg cgggtgagta atgtctggga aactgcctga cggaggggga taactactgg aaacggtagc taatacggca taactcggca agcacaaaa ggggacctt aggcctcttt gccatcggat gtgcccagat gggattagct ataggtggg gtaacggctc acctagggca gcatccctag ctggctctga aggatgacca gcaacactgg aactgagaca cggtcagagc tctctacggga ggcagcagtg gggaaatattg'. To the right of the text area is a 'Query subrange' section with 'From' and 'To' input fields. Below the text area is an 'Or, upload file' section with a 'Parcourir...' button and 'Aucun fichier sélectionné.' Below that is a 'Job Title' input field. There is a checkbox for 'Align two or more sequences'. The next section is 'Choose Search Set'. It has 'Database' with radio buttons for 'Standard databases (nr etc.)', 'OrRNA/ITS databases', 'Genomic + transcript databases', and 'Betacoronavirus'. A dropdown menu shows 'Nucleotide collection (nr/nt)'. There is an 'Organism' input field with an 'exclude' checkbox. There are checkboxes for 'Exclude' (Models, Uncultured/environmental sample sequences) and 'Limit to' (Sequences from type material). There is an 'Entrez Query' input field. The next section is 'Program Selection'. It has radio buttons for 'Highly similar sequences (megablast)', 'More dissimilar sequences (discontiguous megablast)', and 'Somewhat similar sequences (blastn)'. There is a 'Choose a BLAST algorithm' dropdown. At the bottom, there is a large blue 'BLAST' button. To its right is a tooltip: 'Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)'. There is a checkbox for 'Show results in a new window'. At the very bottom, there is a link for '+ Algorithm parameters'.

**Fig. 4 :** Réalisation du blast sur le site internet du NCBI (blastn).

On peut ainsi réaliser des comparaisons avec les séquences de la banque de données les plus proches de la souche à identifier, cette identification est rendue avec un pourcentage d'homologie (Fig. 5). Ce pourcentage présente le degré de similitude entre l'ADNr 16S de la souche à identifier et les séquences des souches de la banque de données (Fig. 5).

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy		
Sequences producing significant alignments				Download		
Manage Columns				Show 100		
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected		GenBank    Graphics    Distance tree of results				
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli strain SG4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2667	2667	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MN318323.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli strain E1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2667	2667	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MK881022.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli strain MSK 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2667	2667	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MK572635.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone KSR-CFL13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2667	2667	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KR612061.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone RPR-CFL31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2667	2667	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KR612036.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli strain U 5/41 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	2667	2667	100%	0.0	100.00%	<a href="#">NR_024570.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia sp. strain 3BT 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2656	2656	100%	0.0	99.86%	<a href="#">MH782105.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli strain ST95-32 chromosome, complete genome</a>	2641	18437	100%	0.0	99.45%	<a href="#">CP043950.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Escherichia coli strain BCE049 chromosome, complete genome</a>	2641	18431	100%	0.0	99.45%	<a href="#">CP042250.1</a>

Fig. 5 : Résultat du blast (la séquence utilisée pour ce blast est celle d'*E. coli*).

Pour avoir une identification fiable, il faut de séquencer au moins 500 et l'idéal c'est de séquencer 1300 à 1500 bp. Le pourcentage minimal d'homologie de séquence permettant l'identification d'une espèce bactérienne est  $\geq 97\%$ .

### b) Intérêt de la technique du séquençage de l'ADNr 16S

Le séquençage de l'ADNr 16S est l'une des techniques d'identification les plus intéressants dans le domaine de microbiologie, elle permet une identification fiable et précise des espèces pour lesquelles les techniques phénotypiques sont peu fiables ou irréalisables, comme pour les bactéries à croissance lente ou difficile (les mycobactéries), les bactéries phénotypiquement difficiles à identifier (les corynébactéries), les bactéries viables non cultivables (*Bartonella quintana* ou *Coxiella burnetii* en cas d'endocardites à hémocultures négatives) et les bactéries non cultivables (en cas d'antibiothérapie préalable inhibant la culture et la majorité des bactéries du microbiote intestinal). Il est intéressant de noter aussi que cette technique n'a besoin qu'une petite quantité de matériel biologique (bactéries), le travail peut se faire sur une seule colonie ou sans même pas avoir besoin de cultiver le microorganisme, dans ce dernier cas le séquençage de l'ADNr 16S est directement réalisée sur le prélèvement (sang, prélèvements respiratoires, LCR... etc.).

### c) Limites de la technique du séquençage de l'ADNr 16S

L'inconvénient majeur de cette technique c'est qu'elle permet certainement d'exclure une espèce d'un genre si le pourcentage d'homologie est inférieur à 97 %, mais elle ne permet pas d'inclure forcément une espèce dans un genre même si ce pourcentage est supérieur à 97%. Dans certains cas rares, des espèces bactériennes distinctes présentent une similitude d'ADNr 16S très élevée comme le cas de *Bifidobacterium animalis* et *Bifidobacterium lactis* qui présentent une homologie de séquence d'ADNr 16S supérieur à 98,8% alors qu'elles sont phénotypiquement différentes et classées dans deux espèces distinctes. Dans d'autres cas, cette technique est peu résolutive et elle donne, pour la même souche à identifier, plusieurs pourcentages supérieurs à 97 % correspondant à plusieurs espèces différentes, dans ces cas on fait recours à l'hybridation ADN/ADN.

### III.3.2) Technique de l'hybridation ADN/ADN.

L'hybridation ADN/ADN est la technique de référence dans le domaine de la taxonomie bactérienne, elle est la technique la plus fiable et la plus précise parce qu'elle porte sur la totalité du génome bactérien. Le principe de cette technique est basé sur la comparaison du génome bactérien de la bactérie à identifier à un génome d'une bactérie de référence, si les deux génomes présentent un certain degré de similitude, les bactéries correspondantes appartiennent à la même espèce. Cette technique est basée sur le fait que deux molécules d'ADN dénaturées peuvent se réassocier à condition de présenter une homologie. La renaturation est réalisée à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de bactéries appartenant à deux espèces différentes dont l'une est une souche de référence. Dans ces conditions, on obtient d'autant plus de duplex hétérologues que les séquences d'ADN des micro-organismes sont proches. Pour reconnaître la provenance de chaque brin d'ADN dans les hybrides, l'un des ADN est marqué par un isotope radioactif ou par une substance fluorescente.

La température optimale de renaturation ( $T_{or}$ ) est toujours inférieure à la température de dénaturation ( $T_m$ ). En pratique,  $T_{or}$  est choisie à 20-30 °C en dessous de  $T_m$  (environ 60 °C pour les entérobactéries). Pour éviter la réassociation des brins d'ADN marqués, on travaille avec des concentrations d'ADN non marqué environ 1000 à 5000 fois plus élevées.

La solidité et la spécificité des ADN hybrides sont appréciées par la mesure de leur stabilité thermique. La différence de stabilité thermique  $\Delta T_m$ , observée entre les  $T_m$  mesurées dans une réaction homologue (deux brin d'ADN de la même souche bactérienne) et dans une réaction hétérologue (deux brin d'ADN de deux souches bactérienne différentes), mesure très

précisément le degré d'homologie des duplex. La stabilité thermique des hybrides est directement corrélée avec le pourcentage de bases non appariées. La correspondance est d'environ 1 % de bases non appariées pour un  $\Delta T_m$  de 1° C. La définition d'une genomospécies (espèce génomique) et d'une espèce bactérienne fait référence aux techniques d'hybridation ADN/ADN. Les techniques d'hybridation ont également été appliquées à l'hybridation ADN/ARN. Ces techniques ont eu un champ d'application plus restreint que les techniques d'hybridation ADN/ADN, mais elles ont été réalisées pour plus de 350 espèces bactériennes différentes.

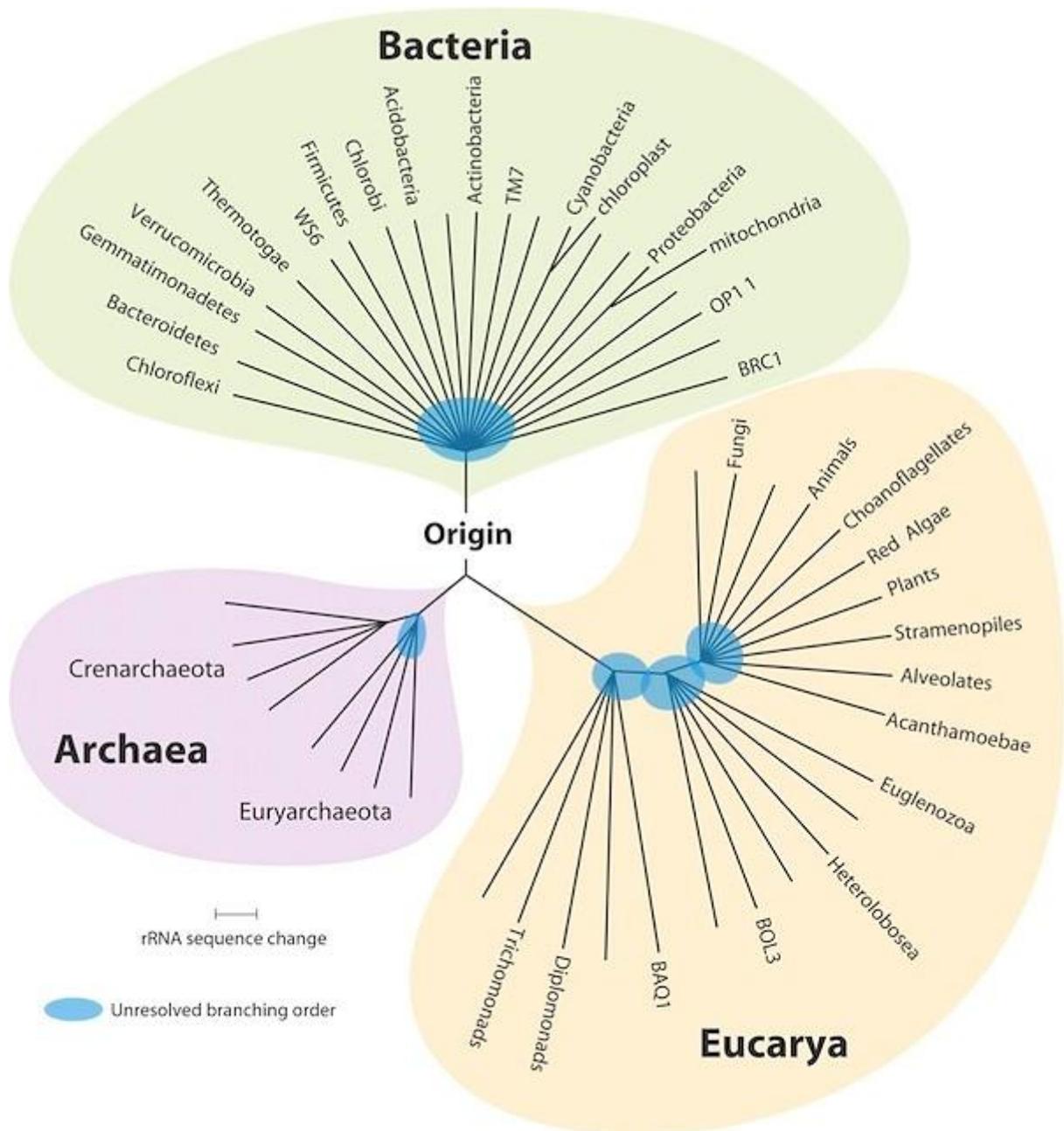
➤ **Définition de l'espèce bactérienne**

En 1987, un comité spécialisé, nommé par l'International Journal of Systematic Bacteriology (ICSB), a donné une définition phylogénétique de l'espèce bactérienne (genomospecies). Cette définition est basée sur l'hybridation ADN/ADN et elle repose sur les résultats obtenus avec plus de 10 000 souches appartenant à environ 2000 espèces bactériennes différentes réparties dans plusieurs centaines de genres. Selon ce comité, une espèce bactérienne est définie phylogénétiquement (genomospecies) comme le rassemblement de souches ayant des relations ADN/ADN qui se traduisent à la fois par des valeurs d'hybridation supérieures ou égales à 70 % et une valeur  $\Delta T_m$  inférieure ou égale à 5 °C. Cette définition n'est valable que pour les espèces bactériennes

## **Partie II : Les groupes Bactériens**

## Introduction

En se basant essentiellement sur les ARN ribosomiques (les gènes ADNr), le monde du vivant est divisé en trois grands domaines : les *Eucarya*, les *Archaea* et les *Bacteria* (ou *Eubacteria* pour les distinguer des *Archaea*). Les bactéries sont classées dans les domaines *Bacteria* et *Archaea* (Figure 3). La différence entre ces deux domaines est essentiellement basée sur la séquence de l'ADNr 16S et la structure de la paroi. Selon le site internet LPSN



**Figure 3 :** Les trois domaines du monde du vivant

(Source : <https://www.podcastscience.fm/dossiers/2011/09/07/dossier-%E2%80%9993-1%E2%80%99arbre-du-vivant-33/>)

(<https://ipsn.dsmz.de/text/numbers>), on compte actuellement 20550 espèces bactérienne (jusqu'à décembre 2020) réparties en 60 phyla dont 51 sont classés dans le domaine des *Bacteria* et 9 dans le domaine des *Archaea*, cependant, beaucoup de ces phyla ne sont pas cultivables. Dans le domaine des *Bacteria*, 30 phyla seulement présente chacun au moins un membre cultivable. Les bactéries non cultivables sont identifiées par des techniques métagénomiques en particulier l'ADNr 16S.

Bien qu'il n'existe pas un ouvrage officiel de systématique bactérienne, le Bergey's Manual ou manuel de Bergey (David Hendricks Bergey, un bactériologiste américain 1860-1937). est considéré comme l'ouvrage de référence. Cet ouvrage présente l'ensemble du monde bactérien, à intérêt médical ou non. La 1<sup>ère</sup> édition remonte à 1923 et comprenait moins de 400 pages. Comme tout ouvrage de systématique quel que soit le domaine, le manuel Bergey's est extrêmement aride à lire et, comme tout ouvrage collectif, il est dépassé sur le plan de la classification et de la nomenclature au moment même de sa parution. Malgré toutes ces critiques, il reste un excellent ouvrage à consulter surtout pour des souches ou des espèces peu fréquentes en pathologie, identifiées au laboratoire.

Il existe deux ouvrages de Bergey's Manual :

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology : c'est un ouvrage de 5 volumes contenant plusieurs milliers de page. Ce livre décrit les bactéries selon leurs positions taxonomiques, il classe les bactéries en Phyla (pluriel du Phylum) Classes, Ordres, Familles, Genres et Espèces, puis il décrit chaque espèce. Cette démarche est extrêmement difficile à suivre. Cet ouvrage est à sa deuxième Edition, le premier volume est sorti en 2001 et le 5<sup>ème</sup> en 2012, ils sont comme suit :

- ✓ Volume 1 (2001): Les Archaea
- ✓ Volume 2 (2005) : Les Proteobacteria (en trois parties A, B et C)
- ✓ Volume 3 (2009) : Les Firmicutes
- ✓ Volume 4 (2010): Les : *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* et *Planctomycetes*
- ✓ Volume 5 (2012) : Les Actinobacteria (en deux parties).

- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology : c'est un manuel de laboratoire basé sur les données de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Pour faciliter l'étude des bactéries, cet ouvrage n'a pas décrit les bactéries selon leurs positions taxonomiques mais il

les a divisées en différents groupes bactériens selon leur morphologie et leur types trophique. Ainsi on trouve les bactéries hétérotrophes à morphologie simple (à Gram positif et à Gram négatif), les bactéries à morphologie remarquable, les bactéries autotrophes, les bactéries sporulées...etc. La dernier Edition de cet ouvrage est la 9<sup>eme</sup> Edition parue en 1993.

# Chapitre I

## Phylum des *Proteobacteria*

Les *proteobacteria* sont un très important groupe de bactérien, il inclut un grand nombre de bactéries à Gram négatif, certaines sont pathogènes et d'autres non pathogènes intervenant dans l'industrie de l'acide acétique (bactéries acétiques) et dans les différents cycles géochimiques dont le plus important est la fixation d'azote. Le phylum des *Proteobacteria* est le plus grand phylum bactérien, il est décrit dans le volume 2 de *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005) en deux parties contenant plus de 1200 pages chacune. Le terme *proteobacteria* provient de leur grande variété morphologique (cocci et bacilles) et métaboliques (hétérotrophes, lithotrophes et phototrophe (photosynthétiques)).

Le phylum des *proteobacteria* contient 5 classes décrites dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005), il s'agit de : *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* et *Epsilonproteobacteria*. Une 6<sup>ème</sup> classe est découverte en 2007, il s'agit de *Zetaproteobacteria*, cette classe ne contient qu'une seule espèce c'est *Mariprofundus ferrooxydans*. Ce phylum contient plusieurs familles de bactéries importantes dans le domaine médical, ces familles sont réparties dans plusieurs classes et plusieurs ordres.

### I) Classe des *Gammaproteobacteria*

Cette classe contient plusieurs ordres importants

#### I.1) Ordre : *Enterobacteriales*

##### I.1.1) Famille : *Enterobacteriaceae* :

Les *Enterobacteriaceae* ou les entérobactéries constituent une vaste famille de bacilles à Gram négatif ayant en commun les caractères suivants :

- Bacilles à Gram négatif
- Non sporulés
- Aérobie anaérobies facultatifs
- Pousse sur milieux ordinaires à pH neutre et à température de 37°C
- Mobiles par des flagelles péritriches ou immobiles,
- Utilisent le glucose par métabolisme fermentaire avec ou sans production de gaz
- Possède une nitrate réductase (réduit le nitrate en nitrite ou en azote moléculaire)
- Dépourvues d'oxydase (cytochrome C-oxydase).

Ces caractères permettent de différencier cette famille des autres familles à Gram négatif comme la famille des *Vibrionaceae* qui sont oxydase + et mobiles par des flagelles monotriches et la famille des *Pseudomonadaceae* qui sont aérobies strictes ayant un métabolisme oxydatif et mobiles par des flagelles polaires.

Les principaux caractères permettant de différencier les genres d'entérobactéries sont :

- La mobilité
- La présence de capsule
- La fermentation ou non de certains sucres dont l'important est le lactose
- La présence de certaines enzymes comme la  $\beta$ -galactosidase et l'uréase
- Possibilité de croissance sur le milieu citrate de sodium (ou citrate Simmons)
- Production d'indole
- Production d'acétoïne (acétyl-méthyl carbinol) ou réaction de Voges-Proskauer (VP)
- Production d'acides mixtes ou réaction du rouge de méthyl (RM).

Grâce à l'étude de ces caractères les *Enterobacteriaceae* sont divisé en plusieurs genres dont les principaux sont *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klesbsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* et *Yersinia*.

Les *Enterobacteriaceae* possèdent aussi des antigènes qui servent à classer les souches de la même espèce en plusieurs sérovars (sérotypes). Trois groupes d'antigènes sont importants :

- ✓ Antigène O : C'est un antigène pariétal thermostable et toxique. Il est constitué de deux molécules contenant chacune une fraction protéique formant le complexe antigénique, une fraction polyosidique déterminant la spécificité de l'antigène et une fraction lipidique liée à fraction polyosidique responsable de la toxicité.
- ✓ Antigène H : C'est un antigène flagellaire constitué d'une substance protéique comparable à la myosine. L'antigène H est thermolabile, détruit par l'alcool à 50% et par les enzymes protéiques.
- ✓ Antigène K : C'est un antigène capsulaire présent chez les bactéries capsulées comme *Klesbsiella*. La présence d'un tel antigène peut, s'il entoure complètement la bactérie, constituer un barrage entre l'antigène O et les anticorps Anti-O faussant ainsi le résultat du sérotypage.

**a) Genre : *Escherichia***

Ce genre comprend cinq espèces : *Escherichia coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* et *E. blattae*. L'espèce type de ce genre est *E. coli*.

- ✓ ***Escherichia coli*** : Cette espèce est connue aussi sous le nom de colibacille. C'est un bâtonnet droit non sporulé, acapsulé gram négatif, mobile par des flagelles péritriches. *E. coli* est une bactérie A.A.F qui pousse facilement sur les milieux ordinaires à 37°C et à pH 7.5. Sur bouillon nutritif elle donne un trouble homogène abondant avec parfois un léger voile en surface. Sur gélose nutritive, elle donne des colonies arrondies, humides, brillantes et de couleur blanchâtre ou légèrement jaunâtre et parfois muqueuses. Sur milieu E.M.B., ses colonies sont d'une couleur violette foncée avec éclat métallique verdâtre caractéristique. *E. coli* ne se développe pas sur le milieu citrate de sodium ni sur les milieux contenant du cyanure de potassium.

*E. coli* réduit les nitrates en nitrites (nitrate réductase +), fermente avec production de gaz le glucose, le lactose et le mannitol, acidifie et coagule le lait et produit de l'indole (indole+). Cependant, elle ne liquéfie pas la gélatine ni les protéines coagulées, ne produit pas d'H<sub>2</sub>S ni de l'acétoïne (VP<sup>-</sup>). Elle possède une β-galactosidase (ONPG+) et une lysine décarboxylase (LDC) mais pas d'uréase.

*E. coli* est un hôte naturel des intestins humains et animaux, mais elle peut jouer un rôle pathogène dans les infections des voies urinaires et biliaires. Certaines sérovars d'*E. coli* provoquent des gastro-entérites infantiles. Ces germes sont identiques sur le plan morphologique et biochimique aux germes banaux mais ils s'en distinguent uniquement par leurs propriétés sérologiques (antigéniques). Les sérovars pathogènes d'*E. coli* responsables d'infections intestinales sont :

- ✓ *E. coli* entéro-pathogène (EPEC) responsable de gastro-entérites infantiles.
- ✓ *E. coli* entéro-invasifs (EIEC) provoquant des syndromes dysentériques chez l'enfant et l'adulte, proches de celui des *shigella*.
- ✓ *E. coli* entérotoxigène (ETEC) responsable d'une maladie appelée la diarrhée du voyageur due à la production d'une entérotoxine.
- ✓ *E. coli* entérohémorragique (EHEC) responsable d'une diarrhée hémorragique provoquée par une toxine appelée Verotoxine ou Shiga-like toxine.
- ✓ *E. coli* entéroaggrégatif (ECEA) responsable de diarrhées chroniques
- ✓ *E. coli* à adhésion diffuse (ECAD) responsables de diarrhées aqueuses chez l'enfant.

### **b) Genre : *Shigella***

Ce genre regroupe des bacilles à Gram négatif, non capsulés, non sporulés, immobiles, AAF et poussent facilement sur gélose nutritive à 37°C et à pH 7. Elles donnent des colonies incolores sur milieu EMB et sur milieu Salmonella/Shigella (S/S), mais elles ne poussent pas sur milieu citrate de sodium (milieu de Simmons).

L'espèce type de ce genre est *Shigella dysenteriae*

- *Shigella dysenteriae* : elle fermente le glucose sans production de gaz et réduit le nitrate en nitrite, mais ne fermentent pas le lactose (lactose -), ne liquéfie pas la gélatine (gélatinase-), ne coagule pas le lait, ne possèdent pas d'uréase, ni catalase, ni  $\beta$ -galactosidase (ONPG -), ni lysine décarboxylase (LDC -) et ne produit d'H<sub>2</sub>S ni d'acétoïne (VP -), ni d'indole.

Chez l'Homme, *Sh. dysenteriae* provoque une entérocolite infectieuse et épidémique appelée la dysenterie bacillaire, elle est caractérisée par des lésions sur le colon accompagné de selles liquides sanglante avec beaucoup de mucus, cette infection est grave chez l'enfant et mortelle en absence de traitement.

### **c) Genre : *Klebsiella***

Les *Klebsiella* sont des bâtonnets Gram négatif, aérobies anaérobies facultatifs (AAF), non sporulés, immobiles et capsulés dans les produits pathologiques. L'espèce type de ce genre est *Klebsiella pneumoniae*

- *Klebsiella pneumoniae* : elle pousse bien sur les milieux ordinaires à 37°C et à pH 7. Sur bouillon nutritif elle donne un trouble uniforme avec un dépôt visqueux. Sur gélose nutritive, ses colonies sont opaques, grandes (environ 5 mm de diamètre), épaisses et visqueuse. Sur milieu EMB, elle donne des colonies violettes avec reflet métallique au centre de la colonie et beaucoup moins abondant que celui d'*E. coli*. Contrairement à *E. coli*, elle se développe sur milieu citrate de sodium et sur les milieux au cyanure de potassium.

*K. pneumoniae* fermente le glucose, le lactose, le saccharose et le mannitol avec production de gaz, elle réduit le nitrate en nitrite, hydrolysent l'urée (Uréase +), produit de l'acétoïne (VP<sup>+</sup>), mais elle ne liquéfie pas la gélatine ni les protéines coagulées, ne coagulent pas le lait, ne produit pas d'indole, ni d'H<sub>2</sub>S, ni acides mixtes (RM<sup>-</sup>).

Cette espèce est un saprophyte des voies aériennes supérieures et digestives de l'Homme et des animaux, mais on la trouve aussi dans le sol, les eaux usées et dans certains aliments comme le lait cru.

Chez l'homme, *K. pneumoniae* est responsable d'angine de pneumopathie aiguë, de bronchite, d'otite et d'infections des voies urinaires et digestives. Elle possède un antigène O (toxique) mais pas d'exotoxine soluble.

#### d) Genre : *Proteus*

Le genre *Proteus* rassemble des bâtonnets Gram négatif, non sporulé et non capsulés.

Ces bactéries sont très mobiles et très envahissantes. Sur gélose nutritive elles donnent des petites colonies après 6h incubation autour desquelles se forme un halo qui gagne rapidement toute la surface du milieu. Cet envahissement peut être inhibé par addition à la gélose de l'alcool éthylique à 5% ou du bromocrésol pourpre à 0,025%, ces substances inhibent la mobilité du germe. L'espèce type de genre est *Proteus mirabilis*

(Figure 2 : culture de *Proteus mirabilis* sur gélose nutritive ordinaire.



- ***Proteus mirabilis*** : Cette espèce bactérienne réduit le nitrate en nitrite, fermente le glucose et le saccharose avec production de gaz, mais ne fermente pas le lactose ni le mannitol. Elle produit l'H<sub>2</sub>S, des acides mixte (RM+) et hydrolysent l'urée (uréase +), mais elle ne produit pas d'indole, ni acétoïne (VP-), ni lysine décarboxylase (LDC-) ni β-galactosidase.

*Proteus mirabilis* est un saprophyte de l'environnement (sol, eaux), c'est un agent de putréfaction connu des déchets organiques.

#### e) Genre : *Salmonella*

Les salmonelles sont des bacilles à Gram négatifs, aérobies anaérobies facultatifs, nitrate réductase + et oxydase -, la mobilité est variable selon les espèces.

La taxonomie du genre salmonella a connue beaucoup de changement au fil du temps. Ainsi, dans les années 90s ce genre contenait plus de 1000 espèces différentes, mais d'après les travaux d'hybridation ADN/ADN, il s'est avéré qu'il ne contient que deux espèces : *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*, le reste sont reclassées comme des sous-espèces

ou des sérovars de ces deux espèces, les sérovars sont caractérisés par trois antigènes : l'antigène O, l'antigène H et l'antigène Vi.

*Salmonella enterica* est subdivisée en sept sous-espèces :

- *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*
- *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*
- *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*
- *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*
- *Salmonella enterica* subsp. *indica*
- *Salmonella enterica* subsp. *salamae* ;
- *Salmonella* subsp. *subterranea* (depuis 2004).

La quasi-totalité des sérovars de *Salmonella* (plus de 2600) sont classés dans les sous-espèces de *Salmonella enterica*. De ce fait, *Salmonella* Typhi est classé comme un sérovar de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* et on l'écrit: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi et pour simplifier l'écriture on écrit *Salmonella* Typhi (la première lettre des sérovars s'écrit en majuscule et sans italique). Tous les sérovars sont considérés comme potentiellement pathogènes dont les plus dangereux sont les *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi.

- ***Salmonella* Typhi** : c'est une bactérie qui fermente le glucose sans production de gaz, produit de l'H<sub>2</sub>S, utilise la voie des acides mixtes (RM+), possède une lysine décarboxylase (LDC+) et pousse le milieu citrate de Simmons (Citrate de Na+), mais elle ne fermente pas le lactose, ne possède pas de β-galactosidase, ni d'uréase et ne produit pas d'indole. Sur milieu S/S, elle donne des colonies incolores avec un centre noire très caractéristique (figure )

*Salmonella* Typhi est responsable de gastro-entérites, de toxi-infections alimentaires et de la fièvre typhoïde (une infection grave et mortelle en absence de traitement).



## **f) Genre : *Yersinia***

Les *Yersinia* sont des bacilles Gram négatifs, aérobies anaérobies facultatifs, ayant une température optimale de croissance entre 28 et 30 °C et une mobilité variable selon les espèces et la température de culture (si mobiles, seulement en dessous de 30 °C). Le glucose et le mannitol sont dégradés avec production d'acides mixtes (RM+) avec peu ou pas de gaz. Ils ne fermentent pas le lactose mais ont un test de ONPG positif. Ils n'utilisent pas du citrate de sodium et ne produisent pas de H<sub>2</sub>S.

Les *Yersinia* se trouvent dans l'eau, le sol et sur les végétaux ainsi que dans le tube digestif et les excréments d'animaux malades ou porteurs sains. Les rongeurs, en particulier les souris, les rat et les écureuils, sont le réservoir naturel des *Yersinia*, mais plusieurs animaux de compagnie (chat, chien, mouton, cheval, hamster...etc.) peuvent être contaminés et deviennent des porteurs asymptomatiques. L'homme peut être accidentellement contaminé par consommation de viandes mal cuites ou par contact avec des animaux infectés.

Le genre *Yersinia* comprend 3 espèces importantes : *Yersinia pestis* l'agent causal de la peste, *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica* responsables de maladies diarrhéiques humaines.

- ***Yersinia pestis*** : elle est caractérisée par un ensemble de tests négatifs comme les tests de : l'uréase, la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC), l'arginine dihydrolase (ADH), la production d'indole, la production d'acétoïne, (VP) et l'utilisation de citrate de sodium. Cependant, certains tests sont positifs comme l'esculine et le rouge de méthyle (RM).

*Yersinia pestis* provoque la peste bubonique et/ou la peste pulmonaire (mortelle). Ce germe pénètre dans l'organisme le plus souvent par voie cutanée à la suite d'une piqûre d'insectes parasites. Les rongeurs jouent un rôle principal dans l'épidémiologie de la peste, la transmission de *Yersinia pestis* de rongeur à rongeur ou de rongeur à l'homme est assurée par les puces. Cependant, le réservoir naturel de *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica* est le sol, l'eau et les végétaux, l'homme s'infecte par voie orale soit par ingestion d'aliments souillés ou par contact avec des animaux domestiques infectés.

## I.2) Ordre : *Vibrionales*

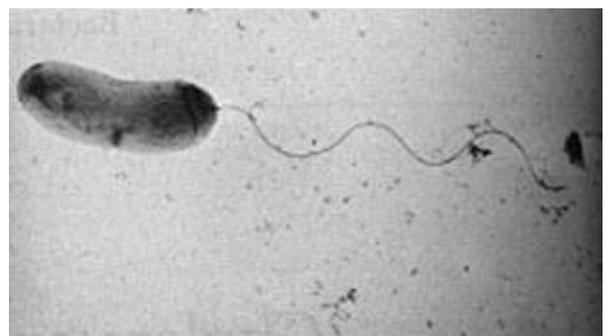
### II.2.1) Famille : *Vibrionaceae*

Les *Vibrionaceae* sont des bâtonnets plus en moins incurvés en virgule, A.A.F et plus ou moins basophiles. Contrairement aux entérobactéries, les *Vibrionaceae* sont oxydase positive et sont mobiles par des flagelles monotriches. Cette famille comprend des genres importants comme : *Vibrio*, *Aeromonas* et *Photobacterium* (bactéries luminescentes)

#### ➤ Genre : *Vibrio*

Les *Vibrio* sont des bâtonnets Gram négatifs incurvés en virgule, mobiles par des flagelles monotriches, non sporulés, non capsulés et aérobies anaérobies facultatifs. Ces bactéries sont des saprophytes des eaux douces et des eaux marines. Leur résistance aux sels s'explique par leur halophilie modérée. L'espèce type de ce genre est *Vibrio cholerae*.

- ***Vibrio cholerae*** : cette espèce se développe facilement sur gélose nutritive où les colonies sont arrondies, lisses brillantes, transparentes ou translucides. Cette espèce se développe sur des milieux alcalins (pH=9.2) et salés à 3% de NaCl, son milieu d'isolement est l'eau peptonée alcaline salée. Elle réduit le nitrate en nitrite, possède une oxydase, une catalase, une LDC et produit de l'indole, elle est protéolytique et peu glucidolytique. *Vibrio cholerae* est responsable du choléra, une maladie grave exclusivement humaine, c'est une toxoinfection intestinale aiguë le plus souvent mortelle en absence de traitement.



### **I.3) Ordre : *Pseudomonadales***

#### **I.3.1) Famille : *Pseudomonadaceae***

La famille des *pseudomonadaceae* regroupe des bacilles Gram négatifs qui se différencient des entérobactéries par la présence d'une oxydase (oxydase +) et des *Vibrionaceae* par leur type respiratoire aérobies stricts. L'habitat naturel des *pseudomonadaceae* est le sol et les eaux douces.

##### **a) Genre : *Pseudomonas* :**

Le genre *Pseudomonas* regroupe des bâtonnets Gram négatifs non asporulés, non capsulés et le plus souvent mobiles par des flagelles polaires (la mobilité dépend parfois des souches et de l'aérobiose). Les *Pseudomonas* sont des aérobies stricts ayant un métabolisme exclusivement oxydatif, ils poussent rapidement sur gélose nutritive à 37°C et à pH 7. La production de pigments est variable selon les espèces, parmi les espèces productrices de pigment(s) on trouve : *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. L'espèce type de ce genre est *Pseudomonas aeruginosa*.

- *Pseudomonas aeruginosa* : cette espèce se développe à des températures comprises entre 4 et 42°C. Sur bouillon nutritif, elle donne un trouble abondant uniforme et coloré en jaune verdâtre. Sur gélose nutritive, les colonies sont arrondies, opaques et lisses avec une couleur jaune verdâtre fluorescente caractéristique qui diffuse dans toute la gélose. Cette couleur est due à la production de deux pigments : la pyocyanine la pyoverdine. *Pseudomonas aeruginosa* produit aussi une molécule aromatique (amino-acétophénone) qui donne une odeur intense, agréable et caractéristique à ces cultures. Les principaux caractères de cette espèce sont : aérobies strict, oxydase +, nitrates réductase +, Catalase+, Gélatinase+, ADH+, indole<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>S<sup>-</sup>, VP<sup>-</sup> et RM<sup>-</sup>.

*Pseudomonas aeruginosa* est responsable d'infections cutanées (pus bleu) ou généralisées (septicopyoémie, méningites), et de gastro-entérites graves.

## I) Classe des *Betaproteobacteria*

### II.1) Ordre : *Neisseriales*

#### II.1.1) Famille : *Neisseriaceae*

Cette Famille de bactéries englobe des cocci à Gram négatif groupées par paires (diplocoques en grains de café) ou en amas, elles sont immobiles et aérobies strictes. Cette famille comprend plusieurs genres important dans le domaine médical comme *Neisseria*, *Moraxella* et *Acinetobacter*.

#### a) Genre : *Neisseria*

Les *Neisseria* sont des aérobies stricts, oxydase + et poussent facilement à 37 °C sur milieux enrichis (gélose au sang). Ce genre comprend deux espèces pathogènes pour l'homme : *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*.

- ***Neisseria meningitidis*** : contrairement à certaines espèces saprophytes du rhinopharynx, cette espèce ne pousse pas à 20 °C. Cette bactérie pénètre, chez l'homme, par les voies aériennes supérieures et provoque une rhinopharyngite parfois inapparente, à partir de ce foyer elle passe dans le sang et provoque une septicémie qui peut se développer en une méningite.
- ***Neisseria gonorrhoeae*** : C'est une espèce difficile à cultiver vu son exigence nutritionnelle culturale, le milieu au sang et à l'amidon et sous atmosphère contenant 10% de CO<sub>2</sub> permet l'obtention d'une culture convenable. *Neisseria gonorrhoeae* est un parasite de l'homme, elle provoque des infections du tractus génital masculin (prostatites, épидидymites) et féminin (cervicites, métrites et salpingites). La transmission de ce germe se fait par voie vénérienne (sexuelle).

## Chapitre II

### Phylum des *Firmicutes*

Ce phylum contient des bactéries à Gram positif à l'exception de la classe des *negativicutes* (des bactéries à Gram négatif), ces bactéries sont décrites dans le volume 3 de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2009) sauf celles de la classe des *negativicutes* parce que cette dernière n'est créée qu'en 2010.

#### I) Classe des *Bacilli*

##### I.1) Ordre des *Lactobacillales*

Cet ordre regroupe des bactéries de forme cocci et d'autres de formes bacille

##### I.1.1) Famille des *Streptococcaceae*

###### a) Genre : *Streptococcus*

Ce genre comprend de plusieurs espèces ayant des caractères bactériologiques très complexes et dont la classification est surtout basée sur des critères antigéniques.

#### a.1) Caractères des streptocoques :

##### ➤ Caractères Morphologique :

Ce sont des cocci arrondis, immobiles, non sporulés, généralement non capsulés, isolés ou en chaînettes plus au moins longues. Ils sont Gram positif mais peuvent apparaître coloré en rose (sous microscope) quand le prélèvement est effectué sur des cultures âgées.

##### ➤ Caractères cultureux :

Les streptocoques sont des aérobies-anaérobies facultatifs, mais une anaérobiose partielle (10% de CO<sub>2</sub>) favorise leur culture, certaines espèces sont difficilement cultivables et exigent des milieux enrichis au sang. Les milieux usuels des streptocoques sont: le bouillon péptoné glucosé tamponné, le bouillon cœur-cervelle (BHI), le milieu Trypticase-soja, le milieu Columbia au sang frais. Comme il existe aussi des milieux sélectifs pour les streptocoques comme gélose Columbia additionné de l'acide nalidixique et de la colimycine, la gélose BEA (bile-esculine-azide) sélective des streptocoques du groupe D, la gélose Slanetz sélective des *Streptococcus faecalis*.

Ces bactéries poussent à une température de 37°C et à un pH 6.5- 7.5. Sur milieu solide, les colonies de *Streptococcus* sont généralement petites, arrondies, grisâtres et opalescentes. Dans les milieux liquides, on observe des amas floconneux avec liquide clair.

➤ **Caractères biochimiques :**

Les *Streptococcus* ont un pouvoir protéolytique faible du fait qu'ils ne possèdent que des exo-protéases (ou exopeptidases). Ils sont indole négatifs et H<sub>2</sub>S négatifs, ils provoquent sur la gélose au sang frais une hémolyse de type différent suivant les espèces.

Tous les *Streptococcus* sont dépourvus de cytochrome oxydase et de catalase, mais ils possèdent une peroxydase qui leur permet de pousser en aérobiose. Les streptocoques (surtout du groupe D) fermentent l'esculine, poussent en milieu bilié et milieu hyper salé à 6.5%. Cependant, les *Streptococcus* ont une tendance à l'autolyse spontanée dans les milieux non tamponnés. Ils résistent à l'action des colorants (cristal violet). Certaines espèces (groupe A) secrètent des enzymes (streptolysine S, streptolysine O, streptokinase ...) et des toxines (toxine érythrogyne). Le pouvoir pathogène est variable suivant les espèces.

**a.2) Classification des *Streptococcus***

➤ **L'ancienne classification (classification sérologique) :**

Cette classification est basée sur les travaux de Lancefield (Rebecca Craighill Lancefield microbiologiste américaine, 1895-1981), qui a montré l'existence de deux antigènes : un antigène de groupe (antigène C) et un antigène de type (antigène M), cette classification a permis de distinguer 2 catégories de *Streptococcus* :

- **Les *Streptococcus* sérologiquement classables :** Cette catégorie possède un antigène spécifique de groupe c'est l'antigène C, il est de nature polysidique et situé dans la paroi. Cet antigène est à la base du groupage sérologique des *Streptococcus* en 18 groupes sérologiques : A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T). Parmi ces groupes, trois seulement sont pathogène pour l'homme et/ou l'animal, il s'agit des groupes : A, D et G.

Dans le groupe A (groupe pathogène), il existe des sérotypes fondés sur la présence d'un autre antigène spécifique de type et associé à la virulence, il est appelé l'antigène M. ce dernier est de nature protéique et est situé également dans la paroi mais plus en surface. Selon cet antigène, il existe 56 sérotypes de streptocoques.

- **Les *Streptococcus* sérologiquement non classables :** ces streptocoques sont dépourvus d'antigène de groupe, donc ils sont classés selon leurs caractères biochimiques.

## ✓ Exemples de Streptocoques

- **Les Streptocoques du groupe A** : ce groupe contient des streptocoques pathogènes pour l'Homme et/ou l'animal, l'espèce la plus importante de ce groupe est *Streptococcus pyogenes*, cette espèce est responsable de la majorité des infections à streptocoques. Chez l'Homme, elle provoque plusieurs maladies comme : angine, scarlatine, impétigo, endométrite, septicémie.

- **Les Streptocoques fécaux ou groupe D** : ils sont d'origines intestinale humaine et animale d'où leur nom, il s'agit des espèces suivantes : *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus durans*, *Streptococcus bovis* et *Streptococcus faecium*. Ce sont des indicateurs de contamination fécale des denrées alimentaires, mais aussi ils peuvent être responsables d'intoxications alimentaires ou d'endocardites.

- **Les Streptocoques lactiques ou groupe N** : ce sont des bactéries qui se trouvent naturellement dans le lait et les produits laitiers comme le yaourt et les fromages. Dans ce groupe on trouve *Streptococcus thermophilus*.

### ➤ La nouvelle classification

Actuellement, et en se basant sur le séquençage de l'ADNr 16S, le genre *Streptococcus* ne contient que des espèces plus ou moins pathogène pour l'homme ou l'animal à l'exception de *Streptococcus thermophilus*, les autres espèces de streptocoques sont reclassées dans des nouveaux genres et familles dont les plus importants sont :

- Le genre *Lactococcus* (famille des *Streptococcaceae*) : il ne regroupe que des streptocoques lactiques (la majorité du groupe N).
- Le genre *Enterococcus* (Famille des *Enterococcaceae*) : il contient des streptocoques fécaux (groupes D) à l'exception de *Streptococcus bovis*. Ce genre contient aussi certaines espèces lactiques comme *Enterococcus lactis*

### **I.1.2) Famille des *Leuconostocaceae***

#### ➤ **Genre : *Leuconostoc***

Ce sont des bactéries lactiques se trouvant sur les fruits, dans le lait et les produits laitiers. Ces bactéries sont immobiles, aérobies-anaérobies facultatif et catalase négative, elles sont exigeantes à des facteurs de croissance. Leur métabolisme énergétique est hétérofermentaire (fermentation du glucose avec production d'acide lactique, d'éthanol et du gaz carbonique), le glucose est catabolisé par la voie hétérofermentaire qui sert aussi de catabolisme des pentoses. L'utilisation des *Leuconostoc* dans l'industrie laitière reste assez axée sur le beurre et les fromages frais pour la production du diacétyl. Toutefois la production de CO<sub>2</sub> est largement exploitée dans les fromages à pâte persillée permettant l'implantation régulière de *Penicillium roqueforti*.

### **I.1.3) Famille : *Lactobacillaceae***

#### **a) Genre : *Lactobacillus***

Ce genre fait partie des bactéries lactiques, il regroupe des bactéries bacille Gram +, généralement immobiles, anaérobies facultatifs, leur culture est favorisée par une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> et leur exigence nutritionnelle varie selon les espèces. Leur métabolisme énergétique est exclusivement fermentaire. Suivant les produits de fermentation du glucose on distingue :

- **Les lactobacilles homofermentaires strictes** : ces bactéries utilisent le glucose par voie homofermentaire (EMP) car elles ne possèdent pas l'enzyme de la voie hétérofermentaire (la pentose phosphocétolase), donc elles sont incapables d'utiliser les pentoses et le gluconate. Généralement, le produit final de la fermentation du glucose est uniquement l'acide lactique. Exemple : *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.
- **Les lactobacilles hétérofermentaires strictes** : elles utilisent le glucose par la voie hétérofermentaire qui sert aussi pour le catabolisme des pentoses (à ne pas confondre avec la voie des pentoses phosphate). Les produits finaux de la fermentation du glucose sont l'acide lactique, l'acide acétique et le CO<sub>2</sub>. Exemple : *Lactobacillus frumenti* et *Lactobacillus brevis*.
- **Les lactobacilles hétérofermentaires facultatives** : elles possèdent les enzymes des deux voies métaboliques (homofermentaires et hétérofermentaires), par conséquent elle se comportent comme des bactéries homofermentaires en présence des hexoses comme le glucose et comme des bactéries hétérofermentaires en présence des pentoses ou du gluconate. Exemple : *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus plantarum*.

## **b) Genre *Pediococcus***

Ce sont des cocci disposées en tétrades, immobiles, microaérophile, nécessitant des facteurs de croissance. Ce sont des bactéries lactiques se trouvent sur les végétaux et dans les produits laitiers. Leur métabolisme énergétique est homofermentaire (fermentation homolactique par la voie EMP).

## **I.2) Ordre des *Caryophanales***

Cet ordre est anciennement appelé *Bacillales*, il englobe des groupes bactériens très hétérogènes : des cocci, des bacilles, des spoulés et des non sporulés.

### **I.2.1) Famille : *Staphylococcaceae***

#### **a) Genre *Staphylococcus* :**

Ce genre regroupe des cocci Gram positif, non sporulés, non capsulés, immobiles disposés en amas irréguliers. L'espèce type de ce genre est *Staphylococcus aureus*.

#### **a.1) Espèce : *Staphylococcus aureus***

➤ **Morphologie :** Ce sont des cocci arrondis regroupés en amas souvent en grappe de raisin.

➤ **Caractères culturels :** *St. aureus* est une bactérie aérobie anaérobie facultative qui pousse très facilement sur tous les milieux ordinaires à température de 37°C et à pH optimum de 7.5. Sur bouillon nutritif elle donne un trouble uniforme abondant en 24h d'incubation et un dépôt et parfois un léger voile à la surface au bout de 48h. Une culture sur gélose nutritive permet l'observation de colonies à surface, arrondies, humides et opaques. Elle pousse sur des milieux contenant des inhibiteurs pour d'autres bactéries tels que le tellurite de potassium, le chlorure de lithium, le cristal violet et le chlorure de sodium à une concentration de 7.5%. Cette propriété a été mise à profit pour synthétiser des milieux spécifiques d'isolement de *St. aureus* comme le milieu de Chapman et le milieu de Baird Parker. Sur milieu Chapman elle donne des colonies jaunes d'orées et sur milieu Baird Parker elle donne des colonies noires entourées d'un halo clair ou plus ou moins opaque.

➤ **Caractères biochimiques :**

*Staphylococcus aureus* fermente régulièrement le glucose, le galactose, le mannose, le saccharose, le glycérol et le mannitol sans production de gaz. Elle liquéfie plus au moins la gélatine, acidifie et coagule le lait. Elle ne produit pas d'indole, ni H<sub>2</sub>S, mais possède beaucoup d'enzymes comme : une catalase, une lipase, une lécithinase, une phosphatase et une DNase.

- **Production de pigments** : Sur gélose ordinaire ou sur milieu de Chapman, les colonies de *Staphylococcus aureus* sont pigmentées en jaune d'orée (*Staphylococcus*). Les autres espèces de staphylocoques produisent d'autres pigments comme un pigment jaune citron (*Staphylococcus citreus*), un pigment blanc (*Staphylococcus albus*). Ces pigments sont insolubles dans l'eau donc non diffusibles dans le milieu de culture.
- **Production de toxines** : *S. aureus* produit plusieurs toxines comme l'hémolysine  $\alpha$ , la leucocidine et des entérotoxines.
- **Production d'enzymes** : plusieurs enzymes sont élaborées par *St. aureus* comme :
  - La coagulase : C'est l'enzyme la plus importante pour l'identification de cette espèce. *S. aureus* possède deux types de coagulases : une coagulase libre sécrétée dans le milieu de culture et une coagulase liée à la surface du germe. Cette dernière agit directement sur le fibrinogène qu'elle transforme en fibrine formant ainsi autour de la bactérie une coque protectrice contre l'action phagocytaire des leucocytes.
  - Autres enzymes : en plus de la coagulase, *S. aureus* produit d'autres enzymes comme une pénicillinase et une ADNase.
- **Pouvoir pathogène** : *Staphylococcus aureus* est **responsable de nombreuses** infections groupées sous le nom de staphylococcies dont les manifestations cliniques en dehors des septicémies, sont très diverses, à localisation multiple **et** à évolution aiguë ou chronique. Les infections staphylococciques sont favorisées par un certain nombre de facteurs généraux en particulier des facteurs de terrain (avitaminose, troubles nutritionnels, dérèglements hormonaux ...). Le principal facteur de terrain est l'état diabétique, souvent révélé par des infections cutané-muqueuses fréquentes et tenaces.

Les infections non septicémiques peuvent avoir des localisations très diverses : infections cutanées et sous cutanées, infections oto-rhinolaryngologiques (ORL), infections ostéo-articulaires, infections uro-génitales et infections digestives. Les staphylococcies septicémiques résultent du passage répété, dans le sang, de germes provenant d'un foyer initial. La porte d'entrée est soit cutanée soit génitale (avortement provoqué). Ces septicémies sont favorisées par des traumatismes locaux comme des corps étrangers (cathéters, sonde.), des interventions chirurgicales, des brûlures, ou par des maladies tel que le diabète, l'insuffisance rénale chronique, le cancer...etc.

## **I.2.2) Famille des *Listeriaceae***

### **a) Genre *Listeria***

Le Genre *Listeria* rassemble des petits bacilles Gram+, non sporulé, catalase+, leur mobilité est variable selon la température (elles ne sont mobiles qu'à 20-25°C). La présence d'une capsule est peu probable mais son absence n'est pas complètement prouvée.

Les bactéries de ce genre sont rencontrées dans la flore pharyngée, intestinale et vaginale, elles se trouvent également dans l'environnement, dans les fromages et les viandes contaminés. Les *Listeria* sont des bactéries résistantes aux conditions hostiles, elles poussent à des températures allant de 1 à 45°C (optimum : 30-37°C). La capacité remarquable de ces bactéries à se multiplier à basse température pose un sérieux problème pour les produits réfrigérés contaminés. De plus elles résistent assez bien au chauffage jusqu'à 55°C et à la salinité (20% de NaCl). Les *Listeria* poussent à un pH allant de 5.6 à 9.6 avec un optimum de 7 et elles survivent jusqu'à pH 3,5.

Le genre *Listeria* contient plusieurs espèces, certaines n'étant que des saprophytes ou commensales, d'autres sont pathogènes, parmi les espèces pathogènes on trouve *Listeria monocytogenes*. Cette bactérie est auxotrophe à des facteurs de croissance comme la biotine, la riboflavine et la thiamine...etc. Chez l'Homme, *Listeria monocytogenes* provoque une septicémie qui peut se métastaser en méningite souvent mortelle, l'infection maternelle entraîne souvent un avortement ou une interruption de grossesse (prématuration), la contamination du fœtus a lieu avant l'accouchement par voie transplacentaire.

## **I.2.3) Famille : *Bacillaceae***

### **➤ Genre *Bacillus* :**

Les *Bacillus* sont des bâtonnets sporulés à Gram+, catalase +, aérobies stricts ou aérobies anaérobies facultatifs (AAF) selon les espèces. Ce genre est divisé en 3 groupes selon la forme de la spore

- Groupe 1 : Spore ovale non déformante (centrale ou subterminale). Exemple : *B. cereus*, *B. anthracis*.
- Groupe 2 : Spore ovale déformante (centrale, terminale ou subterminale). Exemple : *Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans*.
- Groupe 3 : Spore est ronde terminale déformante. Exemple : *Bacillus pasteurii*

Les *Bacillus* sont des bactéries telluriques, mais ils se trouvent aussi dans l'eau et les aliments contaminés

- ***Bacillus anthracis*** : cette espèce est responsable de la maladie du Charbon (ou anthrax) qui touche l'Homme et plusieurs espèces animales (mammifères et volailles). Chez l'Homme l'infection est souvent cutanée à 99% des cas. Après 3 à 5 jour d'incubation, il y a apparition de pustule noirâtre avec des petites vésicules (escarre). La guérison sans traitement antibiotique est dans 90% des cas, cependant il y a un risque de sepsis ou méningite mortelle. Il y a une autre forme d'anthrax, c'est la forme gastro-intestinale provoquée par l'ingestion de viande contaminée, elle est caractérisée par une diarrhée sévère et escarre intestinal. Cependant, La forme la plus grave de l'anthrax est la forme pulmonaire, elle est causée par l'inhalation des spores provoquant un œdème fatal en 3 jours dans 95% des cas.
- ***Bacillus cereus*** : elle est responsable de toxi-infections caractérisées par des diarrhées et une intoxication alimentaire (ingestion d'entérotoxines préformées dans l'aliment) caractérisée par des vomissements causés par l'ingestion d'une toxine (le céréulide).

## II) Classe des *Clostridia*

### II.1) Ordre des *Eubacteriales*

#### II.1.1) Famille : *Clostridiaceae*

##### ➤ Genre : *Clostridium* :

Les *Clostridium* sont des gros bacilles Gram positive, anaérobies stricts et ayant des spores déformantes. La plupart des espèces sont mobiles par des flagelles péritriches. Sur gélose au sang, ils donnent des grandes ou des petites colonies selon les espèces, la plupart des espèces sont hémolytiques.

- ***Clostridium botulinum*** : C'est l'agent causal du botulisme. C'est une bactérie tellurique que l'on trouve occasionnellement dans l'intestin des animaux et dans les aliments contaminés. C'est un bacille mobile très protéolytique et très glucidolytique, il produit une spore ayant une thermorésistance élevée (3-5 heures à 100°C et 15 minutes à 120°C). Ces spores peuvent contaminer les légumes, les fruits, les viandes et d'autres produits alimentaires. Actuellement, le principal danger réside dans les conserves alimentaires. Le botulisme est une intoxication alimentaire résultant de l'ingestion de toxines préformées par les spores de *C. botulinum* ayant germé et produit leurs toxines dans l'aliments contaminés (ce germe est parfois isolé dans les aliments mais jamais chez l'homme). L'incubation de la maladie est courte, 18 à 96 heures, selon la quantité de toxine absorbée, les signes cliniques sont essentiellement neurologiques. Selon la quantité de toxine ingérée, le botulisme peut se manifester par un simple trouble de vision jusqu'à une paralysie respiratoire ou arrêt cardiaque.

Les toxines botuliniques sont de nature protéique, synthétisées par la bactérie sous forme inactive au cours de sa croissance dans l'aliment, lors de la mort bactérienne, les toxines subissent une protéolyse qui les met sous leurs formes actives. Il y a 6 toxines botuliniques : A, B, C, D, E et F. Les variétés A, B et E sont les plus couramment associées à la maladie humaine, elles sont parmi les substances les plus toxiques connues.

- ***Clostridium tetani*** : C'est l'agent causal du tétanos, c'est un bacille mobile à Gram positif donnant une spore terminale déformante, de ce fait le bacille aura un aspect caractéristique en clou. Cette espèce bactérienne se retrouve partout dans le sol où elle survit sous sa forme sporulée, elle est aussi un commensal du tube digestif de plusieurs espèces animales (cheval, bovins, ovins) et une fois éliminée par les selles elle sporule dans le sol. *Clostridium tetani* n'est pas un germe invasif, l'infection reste strictement limitée dans les tissus devitalisés où les spores ont été introduites comme les blessures, les brûlures et les ligatures. Le volume de tissu infecté est petit, la maladie est presque uniquement une toxémie. L'incubation dure de

4-5 jours à plusieurs semaines. Bien qu'il existe plusieurs souches de *Clostridium tetani*, toutes produisent la même neurotoxine : la tétanospasmine.

La neurotoxine produite dans les tissus infectés gagne le système nerveux central par voie lymphatique ou sanguine. Les symptômes cliniques commencent souvent par des spasmes musculaires de la zone blessée et par des contractures douloureuses plus ou moins généralisées. La mort survient souvent par asphyxie aiguë au cours d'un spasme laryngé.

- ***Clostridium perfringens*** : Il se distingue des autres *Clostridium* par son immobilité et sa possession d'une capsule. En culture, il est fortement hémolytique et produit une quantité importante de gaz par fermentation. *C. perfringens* est présent dans le sol, dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Il secrète une toxine protéique, c'est une phospholipase capable de désorganiser les membranes cellulaires en particulier musculaires, cette toxine a aussi un pouvoir hémolytique. *C. perfringens* possède également une ADNase, une hyaluronidase et une collagénase qui favorisent l'extension de l'infection à *C. perfringens*, certaines souches, responsables d'intoxication alimentaire, secrètent une entérotoxine voisine de l'entérotoxine d'*E. coli*.

A partir d'une plaie contaminée, l'infection s'étend en 1 à 3 jours et elle provoque des gangrènes gazeuses, des appendicites, des entérites gangréneuses et des syndromes septicémiques. Par contre, certaines souches de *C. perfringens* provoquent des intoxications alimentaires avec diarrhée abondante qui durent de 1 à 3 jours, par un mécanisme similaire à celui de l'entérotoxine d'*E. coli*.

### III) Classe des *Negativicutes*

Jusqu'à 1991, toutes les bactéries sporulées sont des Gram positives, mais à partir de cette date, des bactéries sporulées à Gram négatif ont été découvertes, toutefois leur affiliation était incertaine. En 2010, ces bactéries sont regroupées dans une nouvelle classe appelée *Negativicutes* affiliée au Phylum des *Firmicutes* (bactéries à Gram positif). Cette affiliation est basée sur la séquence de leurs ADNr 16S ainsi que leur composition en protéines. Cette classe englobe de nombreux genres de bactéries sporulées à coloration de Gram négative repartis sur plusieurs ordres et familles. Parmi ces genres on cite : *Acetonema*, *Anaerospora*, *Desulfosporomusa*, *Sporotalea*, *Sporolituus*, *Pelosinus*, *Sporotalea*, *Propionispora* et *Dendrosporobacter*. Il à noter que cette classe contient aussi des bactéries Gram négatives non sporulées.

## Chapitre III

### Phylum des *Actinobacteria*

Ces bactéries sont décrites dans le Volume 5 de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012).

Les bactéries de ce phylum sont des microorganismes à Gram+ ayant la particularité d'avoir de l'acide mycolique dans la structure de leurs parois. La quantité de cet acide est différente d'une famille à une autre, elle varie de traces comme chez les *Micrococcaceae* à un composant pariétal important comme chez les *Mycobacteriaceae*.

Ce phylum contient quatre ordres importants : *Microsociales*, *Bifidobacteriales*, *Streptomyetales* et *Corynebacteriales*, les quatre font partie de la classe des *Actinobacteria*.

#### I) Classe des *Actinobacteria*

##### I.1) Ordre des *Micrococcales*

##### I.1.1) Famille des *Micrococcaceae*

Cette famille était dans le phylum des *Firmicutes*, mais elle est reclassée dans le phylum des *Actinobacteria* en 2012 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume 5: The Actinobacteria)

##### ➤ Genre : *Micrococcus*

Les microcoques sont des cocci à Gram positif en amas irréguliers ou en tétrades, ils sont immobiles, aérobies stricts à métabolisme oxydatif. Ces bactéries poussent facilement sur les milieux ordinaires. L'espèce type est *Micrococcus luteus* pigmentée en jaune (elle produit un pigment jaune citron insoluble dans l'eau).

**Remarque :** les genres *Streptococcus*, *Staphylococcus* et *Micrococcus* ont été classés dans la même famille des *Streptococcaceae* en se basant sur des caractères morphologiques. Actuellement ils sont reclassés dans des familles différentes appartenant à des classes différentes, voir des Phylum différents.

## I.2) Ordre *Bifidobacteriales*

### I.2.1) Famille : *Bifidobacteriaceae*

#### ➤ Genre : *Bifidobacterium*

Les *Bifidobacterium* sont des bactéries Gram+ de forme variable selon les conditions de culture, la forme la plus connue est la forme bifide (forme de la lettre Y). Ils sont des anaérobies stricts, immobiles, catalase-, nitrate réductase+, indole- et gélatine-, ils produisent de l'acide lactique et de l'acide acétique son production de gaz par une voie fermentaire particulière appelée bifid shunt ou la voie de la F6PPK. Ils font partie de la flore intestinale de l'Homme et des animaux. Chez le nourrisson allaité au sein, *Bifidobacterium bifidum* constitue la partie majeure de la flore intestinale.

**Remarque :** la présence de *Bifidobacterium bifidum* est considérée comme un témoin de bonne santé de l'enfant dans la mesure où cette espèce disparaît dans un certain nombre de processus pathologiques en particulier les diarrhées néonatales. Ceci permet de lui attribuer un effet de barrière vis-à-vis des bactéries pathogènes, cela a conduit à essayer d'implanter dans le tube digestif de nouveau-nés une flore bifide pour rétablir une flore normale en utilisant des préparations commerciales de *Bifidobacterium bifidum*.

## I.3) Ordre *Streptomycetales*

### I.3.1) Famille *Streptomycetaceae*

#### ➤ Genre *Streptomyces*

Ce genre a une importance remarquable dans le domaine médical et industriel comme producteur d'antibiotiques et comme agent de transformations chimiques. Les *Streptomyces* ont un mycelium aérien avec une longue chaîne de conidies non mobiles. Les principales espèces productrices d'antibiotiques sont :

- *Streptomyces antibioticus* produit de l'actinomycine
- *Streptomyces aureofaciens* produit de chlortétracycline
- *Streptomyces erythraeus* produit de l'érythromycine
- *Streptomyces fradiae* produit de néomycine
- *Streptomyces rimosus* produit de l'oxytétracycline

#### **I.4) Ordre des *Mycobacteriales***

##### **I.4.1) Famille : *Nocardiaceae***

###### **➤ Genre : *Nocardia***

Ce sont des bactéries filamenteuses ramifiées à Gram positif. Les *Nocardia* ont peu d'exigences nutritionnelles et se développent sur des milieux ordinaires, les milieux les plus utilisés sont les milieux de Sabouraud et le milieu de Lwenstein-Jensen. L'incubation se fait à 37°C dans une atmosphère enrichie de 5 à 10% de CO<sub>2</sub> pendant plus de 4 jours. Les *Nocardia* sont des bactéries très largement distribuées dans l'environnement et vivent à l'état saprophyte dans le sol où elles participent au processus de fertilisation. Cependant certaines espèces sont des pathogènes opportunistes comme *Nocardia asteroides*. Cette espèce provoque, chez les immunodéprimés, une infection grave : la nocardiose pulmonaire.

##### **I.4.2) Famille : *Mycobacteriaceae***

###### **➤ Genre : *Mycobacterium***

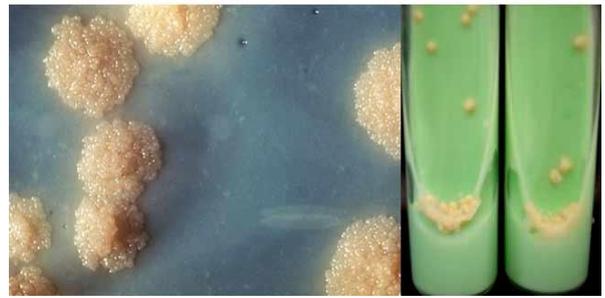
Les *Mycobacterium* ont une caractéristique fondamentale : ce sont des bacilles acido-alcoolo-résistants (B.A.A.R). Cette propriété se met en évidence par la coloration de Ziehl-Neelsen, en effet sous l'action prolongée de la fuchsine à chaud, les bactéries du genre *Mycobacterium* se colorent en rouge et ne se décolorent pas par l'acide nitrique dilué à 1/3 et par l'alcool à 95% comme le sont toutes les autres bactéries. Ces bactéries ne se colorent pas avec la coloration de Gram, elles donnent des cellules incolores.

Le genre *Mycobacterium* comprend deux espèces pathogènes pour l'homme : *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*.

- ***Mycobacterium tuberculosis*** : C'est l'agent causal de la tuberculose. C'est bactérie aérobie stricte et qui ne pousse pas sur milieux ordinaires, en pratique on utilise des milieux enrichis à l'œuf comme le milieu Lowenstein-Jensen ou le milieu Coletsos. Sur le milieu Lowenstein-Jensen, les colonies apparaissent (après plus de 3 semaines) petites et arrondies puis elles se développent en prenant un aspect caractéristique en chou-fleur et leur couleur passe du beige à une couleur chamois (figure 6). La coloration de Ziehl-Neelsen confirme qu'il s'agit de bacille acido-alcoolo- résistant (B.A.A.R).

**Figure 6 :** colonies de *Mycobacterium tuberculosis* sur gélose Lwenstein-Jensen

Source : <https://microbenotes.com/cultural-characteristics-of-mycobacterium-tuberculosis/>



- ***Mycobacterium leprae*** : C'est l'agent causal de la lèpre, une infection chronique, cutanée et nerveuse. L'Homme est le réservoir naturel quasi exclusif de cette mycobactérie. C'est un micro-organisme à multiplication intra-cellulaire (de l'hôte) stricte qui ne peut pas être cultivé in vitro sur des milieux synthétiques. Par conséquent, l'identification de cette espèce est basée sur la mise en évidence des B.A.A.R et sur l'absence de culture des échantillons sur les milieux de Lowenstein-Jensen.

## **Chapitre IV**

### **Phylum des *Tenericutes***

Ces bactéries sont décrites dans le Volume 4 de Bergey's manual of systematic bacteriology (2010).

#### **I) Classe des *Mollicutes***

##### **I.1) Ordre des *Mycoplasmatales***

##### **I.1.1) Famille : *Mycoplasmataceae***

Cette famille comporte des bactéries dépourvues de paroi parce qu'elles sont incapables de synthétiser les précurseurs du peptidoglycane. De ce fait, elles sont polymorphes, nécessitent un milieu isotonique (sinon les cellules éclatent) et totalement insensibles aux bêta-lactamines (famille importante d'antibiotiques). De plus, ces bactéries ne sont colorées par la coloration de Gram mais par celle de Giemsa. Cette famille contient deux genres importants *Mycoplasma* et *Ureaplasma*.

##### ➤ **Genre : *Mycoplasma***

Ce genre contient des bactéries souples et pouvant passer à travers les filtres qui retiennent habituellement les autres bactéries, elles sont les plus petites bactéries connues. Ces bactéries sont difficiles à cultiver vu leur exigence nutritionnelle élevée surtout aux stéroïdes, elles possèdent une NADH oxydase cytoplasmique. Le genre *Mycoplasma* contient beaucoup d'espèces pathogènes pour l'Homme et les animaux. Les plus importantes espèces de *Mycoplasma* pathogènes pour l'homme sont :

- *Mycoplasma pneumoniae* responsable de lésions pulmonaires et pleurales, de myocardites de méningoencéphalites.
- *Mycoplasma genitalium* et *Ureaplasma urealyticum* provoquant des infections sexuellement transmissibles

##### ➤ **Genre : *Ureaplasma***

Ce genre contient plusieurs espèces pathogènes responsables des infections urogénitales comme *Ureaplasma urealyticum* et *Ureaplasma parvum*

- **Espèce : *Ureaplasma urealyticum*** : c'est une bactérie saprophyte faisant partie de la flore vaginale naturelle, mais elle provoque des infections urogénitales en cas de déséquilibre de la flore vaginale. Elle se transmet par rapports sexuels lorsque l'un des deux partenaires est infecté.

## **I.2) Ordre des *Acholeplasmatales***

### **I.2.1) Famille des *Acholeplasmataceae* :**

Cette famille ne nécessite pas les stérols pour leur croissance, la NADH oxydase est localisée dans la membrane cytoplasmique. Elle ne contient qu'un seul genre : *Acholeplasma*. Ce genre contient 21 espèces d'origines différentes : humaine, animale et végétale dont certaines sont pathogènes et d'autres sont des saprophytes. En 2004, le genre *Phytoplasma* a été proposé pour être classé dans cette famille mais cette classification n'a pas été validée.

## Références

- Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley and Staley J.T (2005) : Bergey's manual of systematic bacteriology, 2<sup>nd</sup> Ed., Vol. 2, The Proteobacteria, Part B : The Gammaproteobacteria, Springer-Verlag, New York, NY.
- Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley and Staley J.T (2005) : Bergey's manual of systematic bacteriology, 2<sup>nd</sup> Ed., Vol. 2, The Proteobacteria, Part C : The Alpha-, Beta-, Delta, and Epsilonproteobacteria, Springer-Verlag, New York, NY.
- Holt J.G., Sneath H.P. and Krieg N.R. (1994) : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>th</sup> ed., Williams & Wilkins. Baltimore.
- Krieg N.R., Ludwig W., Whitman W., Hedlund B.P., Paster B.J., Staley J.T., Ward N., Brown D., Parte A. (2010) : Bergey's manual of systematic bacteriology, 2<sup>nd</sup> Ed., Vol. 4 : The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes, Springer-Verlag, New York, NY.
- Marchandin H., Teyssier C., Campos J., Jean-Pierre H., Roger F., Gay B., Carlier J.P., Jumas-Bilak E. *Negativicoccus succinicivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human clinical samples, emended description of the family *Veillonellaceae* and description of *Negativicutes* classis nov., *Selenomonadales* ord. nov. and *Acidaminococcaceae* fam. nov. in the bacterial phylum *Firmicutes*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010; **60**:1271-1279.
- Parte, A.C. (2014). LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. *Nucleic Acids Research*, **42**, Issue D1, D613–D616; DOI: 10.1093/nar/gkt1111.
- Parte, A.C. (2018). LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **68**, 1825-1829; DOI: 10.1099/ijsem.0.002786.
- Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C. and Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **70**, 5607-5612; DOI: 10.1099/ijsem.0.004332
- Prescott L.M, John H., Klein D.A (2003) : Microbiologie, Ed. De Boeck, Louvain-la-Neuve, Belgique.
- Renvoisé A. (2012). Applicabilité de la PCR "universelle" 16S comme outil d'identification et de détection bactérienne en laboratoire hospitalier de bactériologie, Thèse de Doctorat, Ecole doctorale des sciences de la vie et de la sante, Faculté de médecine de Marseille, Université Aix-Marseille, France.
- Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W. (2009) : Bergey's manual of systematic bacteriology, 2<sup>nd</sup> Ed., Vol. 3 : The Firmicutes, Springer-Verlag, New York, NY.

- Whitman W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse, H.J., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K.I., Parte A.T (2012): Bergey's manual of systematic bacteriology, 2<sup>nd</sup> Ed., Vol. 5, The Actinobacteria parts A and B, Springer-Verlag, New York, NY.