

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Enseignement

Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Saïda « Dr. Moulay Tahar »

FACULTE DES SCIENCES

Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie

et Valorisation biologique des Plantes



Département De Biologie

Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de Master  
Spécialité : Biologie

Option : microbiologie appliqué

Présenté par :

Melle DJELLOULI AKILA et RACHEDI MEBARKA

Sur le thème intitulé

**Etablissement d'une méthodologie d'étude  
des Myxobactéries**

Soutenu le 27/09/2021

Devant le jury composé de :

|                         |   |                  |
|-------------------------|---|------------------|
| Mr. SITAYEB Tayeb .     | Professeur (Université de Saïda)              | <b>Président</b> |
| Mr. HALLA Noureddine    | Maître de conférences A (Université de Saïda) | <b>Examineur</b> |
| Mr. BENREGUIEG Mokhtar. | Maître de conférences A (Université de Saïda) | <b>Promote</b>   |

## **Remerciement**

*Avant tout nous remercies le bon Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la patience qui nous ont permis de réaliser ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite . Nous tenons tout particulièrement à adresser nos remerciements les plus vifs d'abord à notre promoteur **Mr Benreguiég MOkhtar**, qui nous a fait l'honneur de diriger notre mémoire sur un sujet passionnant et nous a bien voulu prendre en charge et nous lui sommes très reconnaissants pour ses conseils, sa disponibilité et son sérieux dans le travail.*

*Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres de jury : **Mr Sitayeb Tayeb** qui nous a fait l'honneur par sa présence en qualité de présidente de jury, **Mr Halla Noureddine** qui a accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail et consacré de son temps pour son évaluation.*

*Nous soulignons notre reconnaissance aux enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie notamment **Mr Adli Djallal Eddine** pour son aide, ses précieux conseils et sa disponibilité.*

## Dédicace

*Je dédie ce travail :*

*A celle qui attend mon retour a chaque jour A ma mère: Affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence. La source de tendresse aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner.*

*A mon père : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être et qui m'a toujours encouragée et donné en vie d'aller plus loin.*

*A mes très chers frères Nadhir, Mohamed, Ahmed, Toufik, Mustapha*

*A mes très chères sœurs Fatiha et son mari , Fatima, Meriem*

*A mes deux nièces jumelles Maïssa et Meliisa et Fatima*

*Et mon neveu Khalil Ibrahim Amine*

*A mon binôme et ma deuxième sœur Rachedi Mebarqa et sa famille surtout la petite Maroua*

*Et sans oublier celle qui m'a été d'une aide précieuse Amina cherifi et djihad khelef et ma copine Fatima djaber que je respecte et à qui je souhaite une bonne réussite.*

*A tous mes amis de la promotion de l'année 2021*

## *Dédicace*

*A mon très cher père*

*Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, Et ses encouragements. Que ce travail, soit pour vous, un faible témoignage de ma Profonde affection et tendresse. Qu'ALLAH le tout puissant te préserve, t'accorde Santé, bonheur et te protège de tout mal.*

*A ma très chère mère*

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Qu'ALLAH te protège et te donne la santé, le bonheur et longue vie.*

*A mes chères sœurs : Hanane, Zohra, Maroua*

*A mon seul cher frère : Tayeb Nasrallah*

*A les essences Asmaa Allaa, Mohamed et Youcef*

*A mon fiancé Boumediene Mohamed une personne qui a une place spéciale dans mon cœur, un ami Qui a été a mes cotés tous au long de cette année qui a partagé avec moi beaucoup de choses.*

*En particulier à mon binôme DJELLOULI Akila qui a toujours viellé à me soutenir*

*A toute la promotion microbiologie appliquée chacun par son nom en particulier Djihad Khelef*

## Résumé

L'évolution constante de la résistance bactérienne aux antibiotiques est rapide de plus en plus, ce qui provoque des insuffisances de la thérapeutique antibactérienne. Ces raisons font l'objet de chercher des nouvelles molécules à activité antibactérienne. Les myxobactéries sont apparues comme une source alternative prometteuse de molécules bioactives. L'objectif de cette étude consiste à établir une méthodologie d'étude de ces microorganismes en se basant sur des travaux réalisés déjà dans ce domaine. Quatre méthodes différentes sont utilisées dans l'isolement de myxobactéries par appâtage à l'aide de papier filtre, la méthode des séquences d'*Escherichia coli*, la méthode d'appâtage à l'aide des granulés du fumier de lapin et celle par appâtage à l'aide des stries *Escherichia coli* vivante.

L'isolement est fait de plusieurs biotopes naturels à savoirs le sol (sol des forêts, sol au bord des rivières et le sol thermal, sol des zones arides, sol riche en matières végétales (écorces d'arbres, bois pourris)) et sédiments marins. Pour le pouvoir antagoniste de ces bactéries, la mise en évidence est faite par la technique de cylindres d'agar et la méthode de Fleming. La production des métabolites bioactifs est réalisée par une fermentation submergée dans le milieu CY.

D'après les résultats de trois travaux, qui font l'objet d'une étude comparative réalisés en Japon (1987), Népal (2019) et Algérie (2020), le sol forestier est le plus riche en myxobactéries qui sont isolées par les quatre méthodes. Ce sol a montré le meilleur rendement en nombres isolats (132 isolats). Les myxobactéries obtenus à partir des sédiments marins sont les plus actives vis-à-vis des bactéries pathogènes alors que celles obtenues du sol riche en matière végétale( , bois pourris) sont plus actives contre le champignon *Aspergillus niger*.

**Mots clés :** myxobactéries, Sol, sédiments marins, activité antibactérienne, molécules bioactives.

## Summary

The constant evolution of bacterial resistance to antibiotics is more and more rapid, which causes deficiencies in antibacterial therapy. These reasons are the object of seeking new molecules with antibacterial activity. Myxobacteria have emerged as a promising alternative source of bioactive molecules. The objective of this study is to establish a methodology for studying these microorganisms based on work already carried out in this field. Four different methods are used in the isolation of myxobacteria by baiting using filter paper, the *Escherichia coli* sequence method, the baiting method using rabbit manure granules and the baiting method using rabbit manure. using live *Escherichia coli* streaks.

The isolation is made up of several natural biotopes namely the soil (forest soil, soil along rivers and thermal soil, soil of arid areas, soil rich in plant matter (tree bark, rotten wood)) and sediments sailors. For the antagonistic power of these bacteria, the demonstration is made by the technique of agar cylinders and the Fleming method. The production of bioactive metabolites is carried out by submerged fermentation in the CY medium.

According to the results of three studies, which are the subject of a comparative study carried out in Japan (1987), Nepal (2019) and Algeria (2020), forest soil is the richest in myxobacteria which are isolated by four methods. This soil showed the best yield in number of isolates (132 isolates). Myxobacteria obtained from marine sediments are the most active vis-à-vis pathogenic bacteria whereas those obtained from soil rich in plant matter (, rotten wood) are more active against the fungus *Aspergillus niger*.

**Keywords:** myxobacteria, Soil, marine sediments, antibacterial activity, bioactive molecules.

## ملخص

إن التطور المستمر للمقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية أسرع فأكثر ، مما يسبب نقصاً في العلاج المضاد للبكتيريا. هذه الأسباب هي الهدف من البحث عن جزيئات جديدة ذات نشاط مضاد للبكتيريا. ظهرت البكتيريا المخاطية كمصدر بديل واعد للجزيئات النشطة بيولوجياً. الهدف من هذه الدراسة هو وضع منهجية لدراسة هذه الكائنات الحية الدقيقة على أساس العمل الذي تم تنفيذه بالفعل في هذا المجال. تم استخدام أربع طرق مختلفة لعزل البكتيريا المخاطية عن طريق الطعم باستخدام ورق الترشيح ، وطريقة تسلسل الإشريكية القولونية ، وطريقة الطعم باستخدام حبيبات سماء الأرانب وطريقة الاصطياد باستخدام روث الأرانب باستخدام خطوط الإشريكية القولونية الحية.

تتكون العزلة من عدة بيئات حيوية طبيعية وهي التربة (تربة الغابة ، التربة على ضفاف الأنهار والتربة الحرارية ، تربة المناطق القاحلة ، التربة الغنية بالمواد النباتية (لحاء الأشجار ، الأخشاب الفاسدة)) ورواسب البحارة. من أجل القوة المضادة لهذه البكتيريا ، يتم إجراء العرض بواسطة تقنية أسطوانات أجار وطريقة فليمنج. يتم إنتاج المستقلبات النشطة بيولوجياً عن طريق التخمير المغمر في وسط CY وفقاً لنتائج ثلاث دراسات ، وهي موضوع دراسة مقارنة أجريت في اليابان (1987) ونيبال (2019) والجزائر (2020) ، فإن تربة الغابات هي الأغنى بالبكتيريا المخاطية المعزولة بأربع طرق. أظهرت هذه التربة أفضل محصول من حيث عدد العزلات (132 عزلة) ، وتعتبر البكتيريا الفطرية التي تم الحصول عليها من الرواسب البحرية هي الأكثر نشاطاً مقابل البكتيريا المسببة للأمراض بينما تلك التي تم الحصول عليها من التربة الغنية بالمواد النباتية (، الخشب الفاسد) أكثر نشاطاً ضد البكتيريا. فطر الرشاشيات النيجر.

**الكلمات المفتاحية:** البكتيريا المخاطية ، التربة ، الرواسب البحرية ، النشاط المضاد للبكتيريا ، الجزيئات النشطة بيولوجياً.

## Liste des abréviations

**%** : Pourcentage

**°C** : degré Celsius

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ARNm** : ARN messenger

**ARNr** : Acides Ribonucléiques Ribosomaux

**ARNt** : Acide ribonucléique de transfert

**CMI** : concentration minimale d'inhibition

**CY** : cyclohexyle

**CYB** : CY Bouillon

**DMSO** : Diméthyle sulfoxyde

**E. coli** : *Escherichia coli*

**g** : Gramme

**h** : heure

**kda** : kilodalton

**m** : mètre

**mg** : milligramme

**ml** : millilitre

**mm** : millimètre

**min** : Minute

***Mx. xanthus*** : *Myxococcus xanthus*

**Na Cl** : chlorure de sodium

**NADH** : nicotinamide adénine dinucléotide



**PG** : peptidoglucane

**pH** : Potentiel Hydrogène

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**ST21CX** : Stan21 cycloheximide

**TDA** : Tryptophane désaminase

**UFC** : Unité Faisant Colonie

**VP** : Voges–Proskauer

**WCXA** : Water Cycloheximide Agar

**mg** : Milligramme

**μl** : Microlitre

## Liste des figures

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figure 01</b> : Classification phylogénétique des myxobacteries  | <b>04</b> |
| <b>Figure 02</b> : Souches de type myxobactérien marin sur plaques de gélose  | <b>07</b> |
| <b>Figure 03</b> : Corps de fructification de <i>M. xanthus</i>   | <b>09</b> |
| <b>Figure04</b> : Représentation schématique des fructifications de myxobactéries et de leurs composantes structurelles | <b>12</b> |
| <b>Figure05</b> : La Motilité A et S de <i>M. xanthus</i>   | <b>13</b> |
| <b>Figure06</b> : le mode d'action des antibiotiques  | <b>17</b> |
| <b>Figure07</b> : La structure chimique de Corallopyronine  | <b>19</b> |
| <b>Figure08</b> : La structure chimique de Myxopyronine   | <b>20</b> |
| <b>Figure09</b> : La structure chimique des Ripostatines  | <b>21</b> |
| <b>Figure10</b> : La structure chimique de Sorangicine  | <b>21</b> |
| <b>Figure11</b> : La structure chimique de l'alhimicyne   | <b>22</b> |
| <b>Figure12</b> : La structure chimique d'Angiolame   | <b>23</b> |
| <b>Figure13</b> : La structure chimique d'aurachins   | <b>24</b> |
| <b>Figure 14</b> : La structure chimique de thuggacine  | <b>25</b> |
| <b>Figure15</b> : La structure chimique de Carolactone  | <b>26</b> |
| <b>Figure16</b> : La structure chimique Myxovirescine   | <b>26</b> |
| <b>Figure17</b> : La structure chimique de l'Epothilone   | <b>29</b> |
| <b>Figure18</b> : La structure chimique de ambruticine  | <b>30</b> |
| <b>Figure19</b> : La structure chimique de Soraphène  | <b>30</b> |
| <b>Figure20</b> : Isolement des myxobactéries à l'aide d' <i>E. coli</i> (A) et de papiers filtres (B)                  | <b>32</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figure21</b> : Méthodes d'isolement des myxobacteries à partir du sol                                    | <b>33</b> |
| <b>Figure22</b> : Observation directe de corps de fructification myx obactériens par loupe binoculaire Gx20 | <b>35</b> |
| <b>Figure23</b> : Plaque d'essai biologique   | <b>39</b> |
| <b>Figure24</b> : Photo d'un gel partiellement chargé à l'intérieur d'un appareil d'électrophorèse          | <b>40</b> |
| <b>Figure25</b> : Illustration schématique de la méthode d'isolement des myxobactéries                      | <b>43</b> |
| <b>Figure26</b> : Criblage de l'activité antimicrobienne sur <i>S. aureus</i>                               | <b>46</b> |

## **Liste des tableaux**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tableau 01:</b> Résultat de l'activité antibactérienne des deux isolats contre les deux souches indicatrices déterminées par la méthode de Fleming      | <b>45</b> |
| <b>Tableau 02 :</b> Résultat de l'activité antibactérienne des isolats contre les deux souches indicatrices déterminées par la méthode de cylindres d'agar | <b>45</b> |
| <b>Tableau03 :</b> Propriété lytique des isolats contre deux bactéries   | <b>46</b> |
| <b>Tableau04 :</b> Résultats de l'activité antimicrobienne et l'antifongique obtenus par la méthode de cylindres d'agar                                    | <b>47</b> |

# *Table de matières*

|                   |    |
|-------------------|----|
| Introduction..... | 01 |
|-------------------|----|

## **Synthèse bibliographique**

### **Les Myxobactéries**

|   |    |
|---|----|
| I-1 Généralités .....                                     | 02 |
| I-2 Historique .....                                      | 02 |
| I-3 Taxonomie .....                                       | 03 |
| I-4 Caractères morphologiques .....                       | 04 |
| I -5 Habitat .....  | 05 |
| I -5-1 Dans le sol .....                                  | 05 |
| I -5-2 Dans le milieu aquatique .....                     | 06 |
| I-5-2-1 Dans l'eau douce .....                            | 06 |
| I -5-2-2 Environnements marins/salins .....               | 06 |
| I -6 Métabolisme et comportement social .....             | 07 |
| I -7 Cycle de vie .....                                   | 08 |
| I -8 <i>Myxococcus xanthus</i> .....                      | 09 |
| I -8-1 Corps de fructification de <i>M. xanthus</i> ..... | 10 |
| I -8-2 Motilité .....                                     | 12 |
| I -8-3 Prédation .....                                    | 13 |

### **Métabolites secondaires des myxobactéries**

|   |    |
|---|----|
| II-1- Généralités sur les antibiotiques ..... | 15 |
| II-1-1- définition .....                      | 15 |
| II-1-2- Critères de Classification .....      | 15 |
| II -1-3- Mode d'action .....                  | 16 |
| II -1-3-1 La paroi bactérienne .....          | 16 |
| II -1-3-2 La membrane cellulaire .....        | 16 |

|  |    |
|--|----|
| II -1-3-3 ADN .....  | 16 |
| II -1-3-4 Le ribosome bactérien .....                      | 17 |
| II -1-4-Les catégories des antibiotiques .....             | 17 |
| II -1-4-1 Les antibiotiques à spectre étroit .....         | 17 |
| II -1-4- 2 Les antibiotiques à spectre large .....         | 18 |
| II -2- l'activité antimicrobienne des myxobactéries .....  | 18 |
| II -2-1-Les inhibiteurs ADN polymérase bactérienne .....   | 18 |
| II -2-1-1-Corallopyronine .....                            | 19 |
| II-2-1-1-1 : L'activité antimicrobienne.....               | 19 |
| II -2-1-2-Myxopyronine .....                               | 19 |
| II-2-1-2-1 L'Activité antimicrobienne .....                | 20 |
| II-2-1-2-La ripostatine .....                              | 20 |
| II-2-1-2-1- L'activité antibactérienne .....               | 21 |
| II-2-1-3-Sorangicine .....                                 | 21 |
| II-2-1-3-1 L'activité antibactérienne .....                | 21 |
| II -2-2 Les inhibiteurs de la synthèse des protéines ..... | 22 |
| II -2-2 -1 Althiomycine .....                              | 22 |
| II -2-2 -1 -1 L'activité antibactérienne.....              | 22 |
| II -2- 2 - 2 Angiolame .....                               | 23 |
| II -2-2 -3 Myxovalargines .....                            | 23 |
| II -2-2 -3-1 Activité antibactérienne .....                | 23 |
| II -2-3 Inhibiteurs de la respiration .....                | 23 |
| II -2-3-1 Les aurachins .....                              | 23 |
| II -2-3-1 -1 Activité antibactérienne.....                 | 24 |
| II -2-3-2 Thuggacine .....                                 | 24 |
| II -2-3-2-2 L'Activité antibactérienne .....               | 25 |
| II -2-4 Inhibiteurs de la formation de biofilms .....      | 25 |

|   |    |
|---|----|
| II -2-4 -1 Carolactone .....                                | 25 |
| II -2-4 -1-1 L'activité antibactérienne.....                | 26 |
| II -2-4 -2 Myxovirescine .....                              | 26 |
| II -2-4 -2 -1 L'activité antibactérienne .....              | 26 |
| II -2-5- Antibiotiques d'origine marine Myxobactéries ..... | 27 |
| II -3 Activité enzymatiques des myxobacteries .....         | 27 |
| II -4 l'activité anticancéreuse des myxobactéries .....     | 29 |
| II -4 -1 l'Epothilone .....                                 | 29 |
| II -4 -2 Ixabepilone .....                                  | 29 |
| II -5 Activité antifongique .....                           | 29 |
| II -5 -1 Icumazoles .....                                   | 29 |
| II -5 -2 ambruticine .....                                  | 30 |
| II -5 -3 Soraphène .....                                    | 30 |

## **Techniques d'études**

|   |    |
|---|----|
| III-1 Objectif .....  | 31 |
| III-2 Echantillonnage .....   | 31 |
| III-3 Le traitement .....   | 31 |
| III-3-1- Séchage .....  | 31 |
| III-3-2- Tamisage.....  | 31 |
| III-4 Méthodes d'isolement.....   | 31 |
| III-4 -1 isolement à l'aide de papier filtre .....                                      | 31 |
| III-4-2 Isolement du sol par appâtage à l'aide des stries <i>Escherichia coli</i> ..... | 32 |
| III-4 -3 Isolement à l'aide des séquences d' <i>E.coli</i> .....                        | 33 |
| III -4 -4 Isolement du sol par appâtage avec des granulés de fumier .....               | 34 |
| III -5 Purification .....   | 34 |
| III -6 Observation des caractères morphologique et culturaux .....                      | 34 |

|   |    |
|---|----|
| III -6-1 Corps de fructifications .....   | 34 |
| III -7 La mise en évidences de pouvoir antibactérien .....                      | 35 |
| III -7-1 Confirmation la pureté des souches .....                               | 35 |
| III -7-2 Préparation de l'inoculum .....  | 35 |
| III -7-3 La détermination des activités antibactérienne des myxobactéries ..... | 36 |
| III -8 Extractions des métabolites secondaires .....                            | 36 |
| III -8 -1 La fermentation .....   | 36 |
| III -8 -2 Extraction en phase liquide .....                                     | 36 |
| III -8 -3 La réalisation du test antimicrobien et antifongique .....            | 36 |
| III -8-3-1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....   | 37 |
| III -8-3-1-1 Préparation de dilution .....                                      | 37 |
| III -8-3-1-2 Préparation d'inoculum .....                                       | 38 |
| III -9 L'identification .....   | 39 |

## **Résultats et Discussion**

|   |    |
|---|----|
| IV-1 Echantillonnage.....   | 41 |
| IV-2 Méthode d'isolement.....                                       | 41 |
| IV-3 Purification .....   | 43 |
| IV-4 Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique ..... | 44 |
| IV-4 -1-1 Technique de Fleming .....                                | 44 |
| IV-4 -1-2 Technique de cylindres d'agar .....                       | 45 |
| IV-4-2 -1 Le test antimicrobien .....                               | 45 |
| IV-4 -2 -2 Le test antifongique .....                               | 46 |
| IV-5 Extraction des métabolites secondaire .....                    | 48 |
| IV-5 -1 Extraction en phase solide.....                             | 48 |
| IV-5 -2 Extractions en phase liquide.....                           | 49 |
| IV-6 Discussion générale.....                                       | 49 |
| Conclusion.....   | 51 |



Référence bibliographique.....52

# **Introduction**

## **Introduction**

Outre les actinomycètes et les champignons, les myxobactéries sont l'une des sources importantes de produits microbiens naturels. Les principaux producteurs de métabolites secondaires sont les membres d'*Actinomyces* (environ 8000 composés caractérisés), le genre *Bacillus* (1400), ainsi que *Pseudomonas* (400). Cependant, au cours de la dernière décennie, les myxobactéries sont apparues comme une source alternative prometteuse de molécules bioactives(Müller,2014).

La plupart des métabolites myxobactériens sont des polycétides (PK) ou des peptides non ribosomiques, ou des hybrides des deux classes structurales, et ils sont souvent contiennent des fonctionnalités que l'on retrouve rarement dans d'autres produits naturels(Wenzel, 2010).

Les métabolites secondaires myxobactériens présentent de nombreuses caractéristiques structurales uniques et de nouveaux modes d'action, ce qui en fait des sources attrayantes et prometteuses pour le développement de médicaments. Les propriétés rares mais notables comprennent des activités antibiotiques, antifongiques, immunosuppressives, anticancéreuses (Weissman,2010).

L'usage fréquent et abusif des antibiotiques contre les maladies infectieuses d'origine fongique ou bactérienne est l'un des facteurs essentiels dans le développement et l'évolution de la résistance microbienne (Leif et Larson 2000 ; Maccrain et al.,2005), ce qui accentue l'urgence de découvrir de nouvelles molécules antimicrobiennes d'origines biologiques.

L'objectif de cette étude consiste à faire une synthèse bibliographique sur les myxobactéries ainsi que l'établissement d'une méthodologie expérimentale d'étude de ces microorganismes. Le protocole expérimental sera élaboré en se basant sur les résultats des travaux réalisés dans différents parties du monde.

# **Synthèse**

# **Bibliographique**

## I-1 Généralité :

Les myxobactéries sont des micro-organismes unicellulaires à Gram négatif en forme de bâtonnet , elles possèdent un certain nombre de caractéristiques distinctives, telles qu'une manière particulière de se déplacer sur des surfaces solides , le glissement, le développement de myxospores et la formation de fructifications (**Mandelshtam,2016**).

Les myxobactéries sont des prédateurs naturels des micro-organismes et font l'objet d'efforts concertés pour identifier de nouveaux composés antimicrobiens (**livingstone et al ,2017**).

Elles se retrouvent en abondance dans la plupart des environnements, bien qu'ils soient particulièrement nombreux dans les sols arables tempérés cultivés (**Dawid, 2000**).

## I-2 Historique :

Les myxobactéries forment des fructifications, qui présentent des couleurs vives et sont donc souvent identifiées à l'œil nu. La première myxobactérie, *Polyangium vitellinum* , a été découverte et nommée par le botaniste allemand HF Link en 1809 qui considérait la fructification comme un gastromycète. En 1857, le biologiste britannique MJ Berkeley a découvert et nommé deux autres genres et espèces, *Stigmatella aurantiaca* et *Chondromyces crocatus* qu'il a classés comme hyphomycètes (**Dawid ,2000**).

Le botaniste américain Roland Thaxter, en 1892, fut le premier à identifier que *Chondromyces crocatus* était une bactérie et il avait découvert son stade végétatif unicellulaire.

C'était spectaculaire, car jusqu'à ce moment-là, *C. crocatus* était considéré comme une forme visqueuse depuis plus de 20 ans . Des études de Bauer, Kofler , Jahn et Kühlwein ont suivi au début du 20e siècle. Les myxobactéries ont toujours fasciné les scientifiques en raison de leur comportement social, notamment l'essaimage coopératif, la prédation de groupe et la formation de fructifications multicellulaires. *Myxococcus xanthus* par exemple est devenu l'un des modèles de systèmes pour l'étude du développement procaryote . Aujourd'hui, outre leurs capacités à produire des métabolites secondaires bioactifs prometteurs, les myxobactéries sont de la plus haute importance pour élucider le comportement multicellulaire

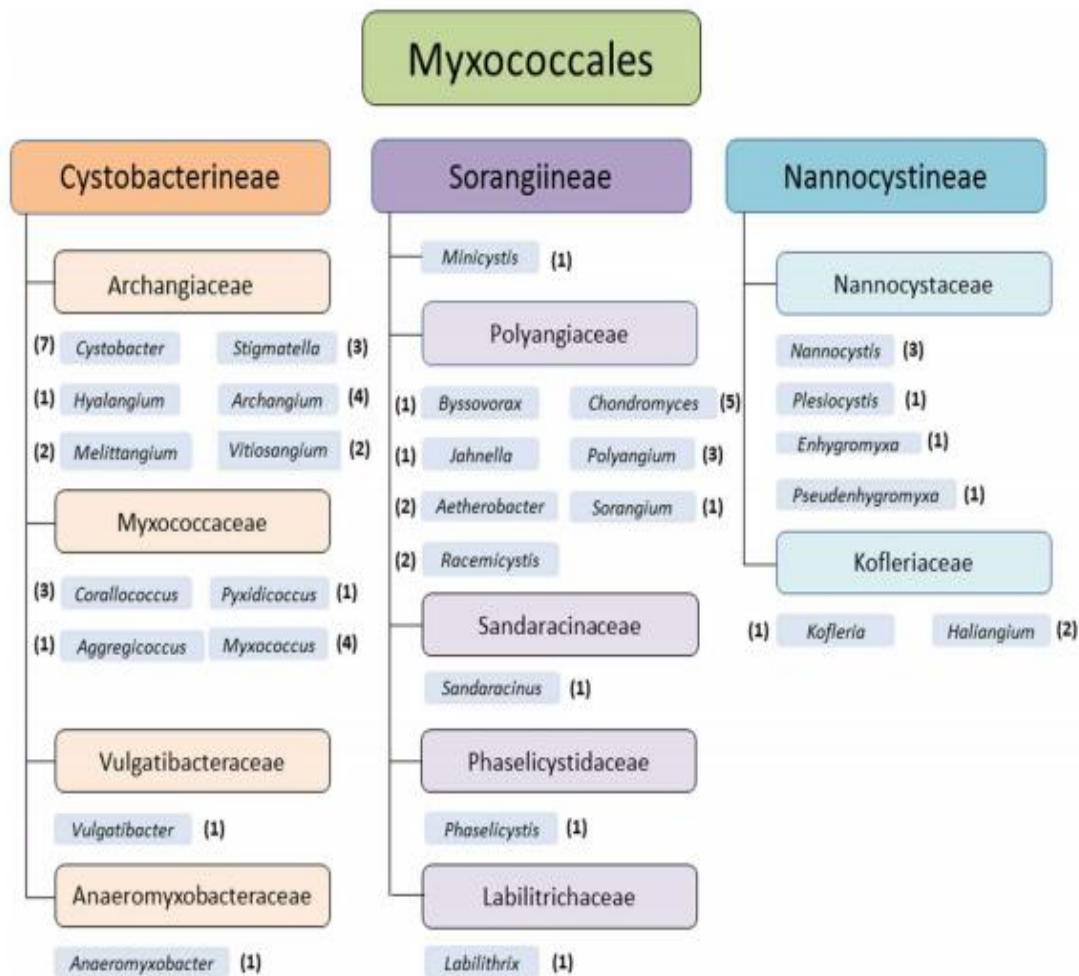
des bactéries, ainsi que pour élaborer la théorie de l'évolution sociale (**Catherine I, Mohr 2018**).

### **I -3 La taxonomie :**

La taxonomie des myxobactéries basées sur leurs analyses de séquence de gènes ARNr 16S, elles sont des deltaprotéobactéries ( **H. Reichenbach ,2001**)

Les myxobactéries peuvent être isolées à partir de diverses sources naturelles telles que le sol, l'écorce, le bois pourri, les feuilles d'arbres, le compost ou les excréments d'herbivores .

Ils vivent en aérobie, à l'exception des seuls genres et espèces anaérobies facultatifs décrits *Anaeromyxobacter dehalogenans* Néanmoins, il est très probable qu'il existe d'autres myxobactéries facultatives ou même strictement anaérobies, qui résistent jusqu'à présent aux efforts d'isolement courants. Actuellement, l'ordre monophylétique Myxococcales comprend 3 sous-ordres, 10 familles, 29 genres et 58 espèces ( **Katherine, Mohr 2018**).



**Figure 01** : Classification phylogénétique des myxobactéries ( K. Mohr,2018)

#### I -4 Caractère morphologique :

Les cellules des myxobactéries sont des bâtonnets de taille moyenne, selon les espèces elles mesurent 0,6 -0,9  $\mu\text{m}$  de large et 3-8  $\mu\text{m}$  de long, Les cellules végétatives se présentent sous deux types différents :

Cellule de type I : bâtonnets minces, généralement à bout flexible, jusqu'à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre et jusqu'à 20  $\mu\text{m}$  de longueur (sous-ordre : Cystobacterinae)

Cellule de type II : bâtonnets rigides cylindriques aux extrémités arrondies jusqu'à 1  $\mu\text{m}$  de large et jusqu'à 10  $\mu\text{m}$  de long (sous-ordre Sorangiineae) , (Dworkin, 2007).

Le génome des myxobactéries est un anneau bactérien typique chromosome, et avec 9450 kpb, il a environ deux fois plus taille de celle d'*Escherichia coli* et environ la taille de celle de le genre *Streptomyces*. L'ADN myxobactérien a une teneur en GC comprise entre 64 et 72 % en moles, en *Mx. xanthus* c'est 65,5 % en moles; dans le sous-ordre des *Sorangineae*, la teneur en GC (70-72 mol%) est un peu plus élevée que chez les *Cystobacterineae* (64 -70 mol%). Entre les différents segments d'ADN, la teneur en GC varie considérablement, par ex. en *Mx. xanthus* entre 36 et valeurs supérieures à 80 % mol. ( **Komano , Franceschini et al ,1987** ) . La plupart des membres de l'ordre des *Myxococcales* initient un programme de développement en réponse à la famine qui entraîne la formation d'un corps de fructification multicellulaire à l'intérieur duquel les cellules se différencient en spores ( **Reichenbach,1999**) Les analyses utilisant *Myxococcus xanthus* comme organisme modèle ont fourni des informations importantes sur la régulation de la formation de fructifications ( **Konovalova, Petters et al ,2010**). Cependant, des études comparatives du génome de différentes séquences du génome de *Myxococcales* ont indiqué que le programme de développement qui aboutit à la formation de fructifications n'est pas hautement conservé ( **Huntley , Hamann et al ,2011**).

## **I -5 Habitat :**

### **I -5-1 Dans le sol :**

Le véritable habitat des myxobactéries est le sol, tant que le pH est légèrement acide à légèrement alcalin, c'est-à-dire entre 5 et 8. On trouve fréquemment des myxobactéries sur les excréments d'animaux herbivores, sur du matériel végétal en décomposition et sur l'écorce des arbres ( **mohr,2017** ) ; parfois, ils ont également été trouvés à la surface des feuilles des plantes ( **Houbraken , Frisvad et al ,2011**) Dans les sols selon leur fréquence d'occurrence les espèces suivantes sont les plus typiques : *Na. exdens*, *Cc. coralloides*, *donc. cellulorum* , différentes espèces de *Polyangium* , *Mx. fulvus* , différentes espèces de *Cystobacter* et *Mx. stipitatus* ( **Bartlett , Gilbert et al , 2013**). Bien que les myxobactéries préfèrent généralement les sols avec un pH presque neutre, elles ont également été signalées dans des



sols acides (pH 3,7) et alcalins (pH 8,0-9,2) (**Karwehl, 2017**).

Les espèces typiques vivant sur l'écorce des arbres et sur le bois pourri sont *Sg. aurantiaca*, *cm apiculatus*, *Cc. coralloides*, *Mx. fulvus*, *cm. pediculatus* et différentes espèces d' *Haploangium* (**Gilbert, 2013**). Le bois pourri est préféré par les espèces *Chondromyces* et *Stigmatella* (**Menne et al, 1988**).

Les crottes d'herbivores sont colonisées préférentiellement par *Mx. fulvus*, *Cc. coralloides*, *Cb fuscus*, *Cb. ferrugineus*, *Ar. serpents*, *Sg. erecta*, *Mx. virescens*, *Mx. xanthus*, et *Cb. velatus* (**Bartlett, 2013**).

## **I -5-2 Dans le milieu aquatique :**

### **I-5-2-1 Dans l'eau douce :**

Dans les environnements aquatiques naturels, les cellules microbiennes construisent souvent un biofilm complexe attaché à la surface communautés. Dans la masse d'eau ou la zone pélagique des eaux douces non polluées la diversité des bactéries est normalement plus faible que sur les substrats disponibles. Les myxobactéries glissent en essaims sur des surfaces solides. Si c'est possible, ils préfèrent attachés contrairement à la vie planctonique. Seules très peu d'études sur les myxobactéries dans les habitats d'eau douce sont publiées.

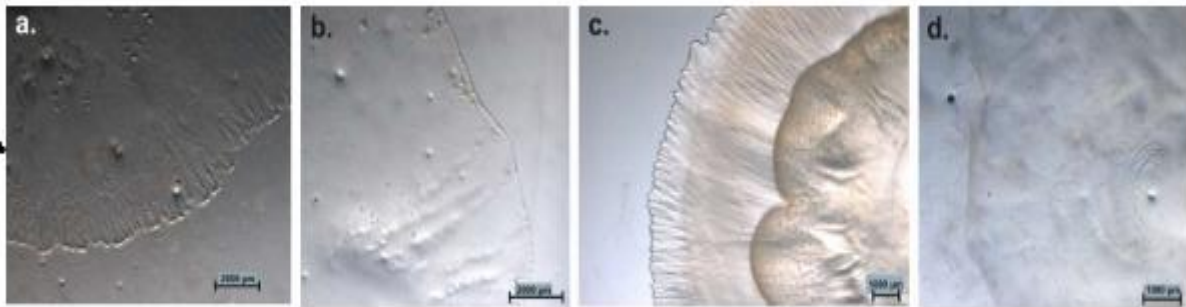
Dans le 1960/1970, plusieurs études ont porté sur des « myxobactéries » non pathogènes ou pathogènes non fructifères en tant que colonisateurs de poissons d'eau douce.

### **I -5-2-2 Environnements marins/salins :**

Couvrant plus d'environ 78 % de la surface de la terre, l'eau est l'élément naturel le plus répandu. substance, dont environ 97,5% sont de l'eau salée dans les océans du monde (**Kaushal, 2018**). La tolérance au sel de myxobactéries est faible en général. On a longtemps supposé que les myxobactéries vivaient exclusivement dans habitats terrestres. En effet, même en 1963, Brockman a observé des myxobactéries fructifères dans des échantillons de sable d'une plage océanique en Caroline du Sud (**Brockman, 1963**). Espèce des genres terrestres déjà connus *Archangium*, *Chondrococcus* (*Corallococcus*), *Chondromyces*, *Myxococcus* et *Polyangium* pourraient être cultivés. Aussi tard comme 2002 avec *Haliangium*

ochraceum et *H. tepidum*, le premier genre myxobactérien a été isolé et décrit des marais salés côtiers. Les souches diffèrent des myxobactéries terrestres connues en ce qui concerne aux besoins en sel (2 à 3 % de NaCl) et il a présence d'acides gras antéisobranchés (**Fudou Jojima, et al ,2002**). D'autres genres, exclusivement détecté dans les habitats marins comme *Plesiocystis* , *Enhygromyxa* et *Pseudenhygromyxa* (tous les Nannocystineae-sous-ordre) suivis.

En 2010, Jiang et al. ont étudié la diversité des myxobactéries marines par rapport aux myxobactéries terrestres du sol (**Velicer, 2014**). Par conséquent, ils ont établi des bibliothèques enrichies en myxobactéries de séquences de gènes d'ARNr 16S provenant de quatre sédiments d'eau profonde et d'un événement hydrothermal et ont identifié 68 séquences différentes liées aux myxobactéries à partir de clones séquencés au hasard de ces bibliothèques. Les auteurs ont conclu que les séquences myxobactériennes étaient diverses mais phylogénétiquement similaires à différents endroits et profondeurs. Cependant, ils se séparent des myxobactéries terrestres à des niveaux élevés de classification



**Figure 02** : Souches de type myxobactérien marin sur plaques de gélose. (a) *Haliangium tepidum* (DSM 14436T) sur VY/2SWS, (b) *Enhygromyxa salina* (DSM 15217T) sur VY/4SWS, (c) *Pseudenhygromyxa salsuginis* (DSM 21377T) sur 1102, (d) *Plesiocystis pacifica* (DSM 14875T) VY/2SWS.

## I -6 Métabolisme et comportement social :

Les myxobactéries sont des aérobies stricts, nécessitant de l'oxygène pour leur croissance (**Reichenbach, 1999**) . Leur principale source de nutriments sont les protéines ou les acides aminés, et donc ils poussent bien sur des milieux de culture à usage général, bien que

lentement. Il semble y avoir un besoin en cations divalents, sinon une autolyse se produit, de sorte qu'une source de magnésium est généralement incluse dans le milieu. Le calcium favorise l'agglutination qui n'est pas préférée en milieu liquide. Dans la nature, les myxobactéries se livrent à ce que l'on appelle communément l'alimentation de la meute de loups.

Les myxobactéries vivent en groupes appelés essaims, et chaque cellule individuelle contribue à une variété d'enzymes hydrolytiques qui décomposent les protéines, les composants de la paroi cellulaire et les acides nucléiques. Une cellule individuelle ne produit pas suffisamment d'enzymes pour subvenir à ses besoins, mais le groupe dans son ensemble est capable de décomposer les polymères dans la zone (**Mohr, 2018**).

### **I -7 Cycle de vie :**

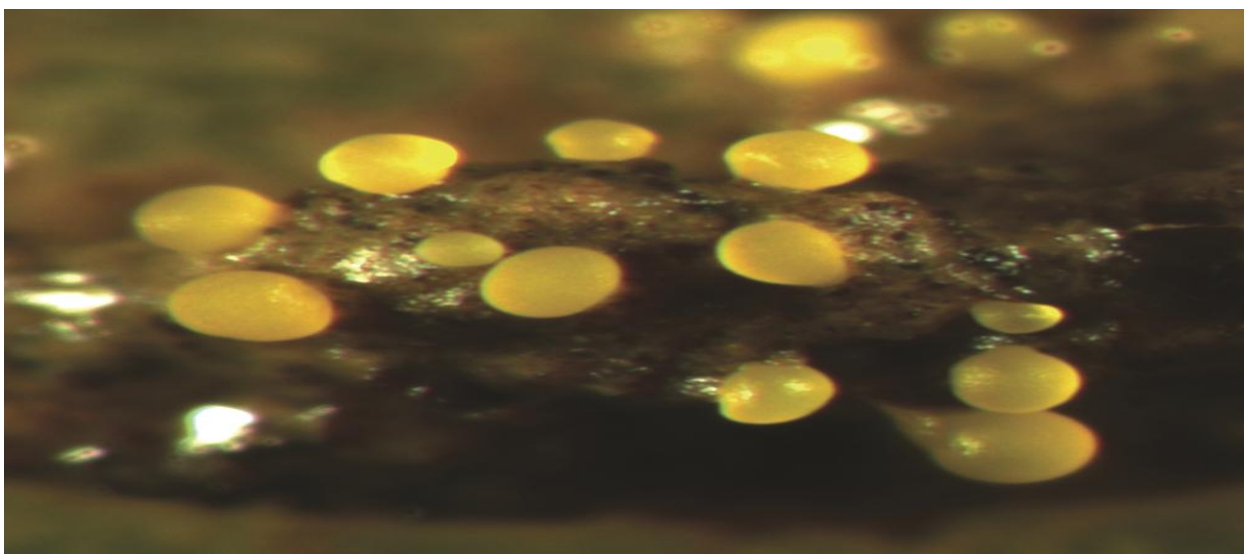
Les myxobactéries sont en communication constante les unes avec les autres grâce à divers moyens, notamment les fimbriae, de longs appendices constitués de protéines avec lesquelles les cellules se touchent. Ils se déplacent à travers un processus appelé motilité de glissement qui reste pour la plupart inexpliqué. Les cellules se déplacent de manière coordonnée et les cellules individuelles quittent rarement le groupe. Lorsque certains acides aminés se raréfient et qu'une croissance équilibrée n'est plus possible, les cellules entament une série de mouvements coordonnés conduisant à la production d'un organe de fructification (**Shimkets, 1999**). Cette structure, entièrement composée de cellules qui se sont empilées les unes sur les autres plus le slime qu'elles ont produit, est de couleur vive et visible à l'œil nu, d'environ 0,1 mm ou légèrement plus grande. De nombreux organes de fructification sont produits par un essaim. De nombreuses cellules de l'essaim subissent un changement de forme d'une longue tige mince à une myxospore plus courte et plus pulpeuse. Ces cellules produisent un revêtement cellulaire qui les rend quelque peu résistantes à la chaleur et plutôt résistantes à la dessiccation, mais ces myxospores n'ont pas l'incroyable tolérance environnementale de l'endospore bactérienne typique. Lorsqu'un

organe fructifère est transporté vers un nouvel emplacement (pensez à un organe collé aux poils des pattes d'un insecte et emporté), toutes les myxospores de la structure «germent» et redeviennent des cellules «végétatives». Ainsi, un nouvel essaim est né; les cellules individuelles n'ont pas besoin de démarrer un nouvel essaim toutes seules (**Diodati et al,2008** ) .

### **I -8 Myxococcus xanthus :**

*Myxococcus xanthus* est une bactérie à Gram négatif qui a été largement étudiée pour sa motilité, son développement multicellulaire et ses comportements prédateurs. Végétatif *M. xanthus* .

Les cellules sont de longs bâtonnets (1  $\mu\text{m}$  de diamètre et 5 à 10  $\mu\text{m}$  de long) qui traversent des cycles cellulaires similaires à ceux d'autres organismes modèles en forme de bâtonnet, tels que *E. coli* et *B. subtilis* . En réponse à certains produits chimiques, les cellules individuelles de *M. xanthus* peuvent dégrader complètement leur PG et former spores sphériques . Lors de la germination, ces spores restaurent la morphologie végétative par assemblage de PG de novo en forme de tige. Comme le PG est généralement essentiel à la survie des bactéries, et ses systèmes d'assemblage sont bien conservés chez la plupart des bactéries, dont *M. xanthus* offre des opportunités uniques pour mieux comprendre les mécanismes du PG .



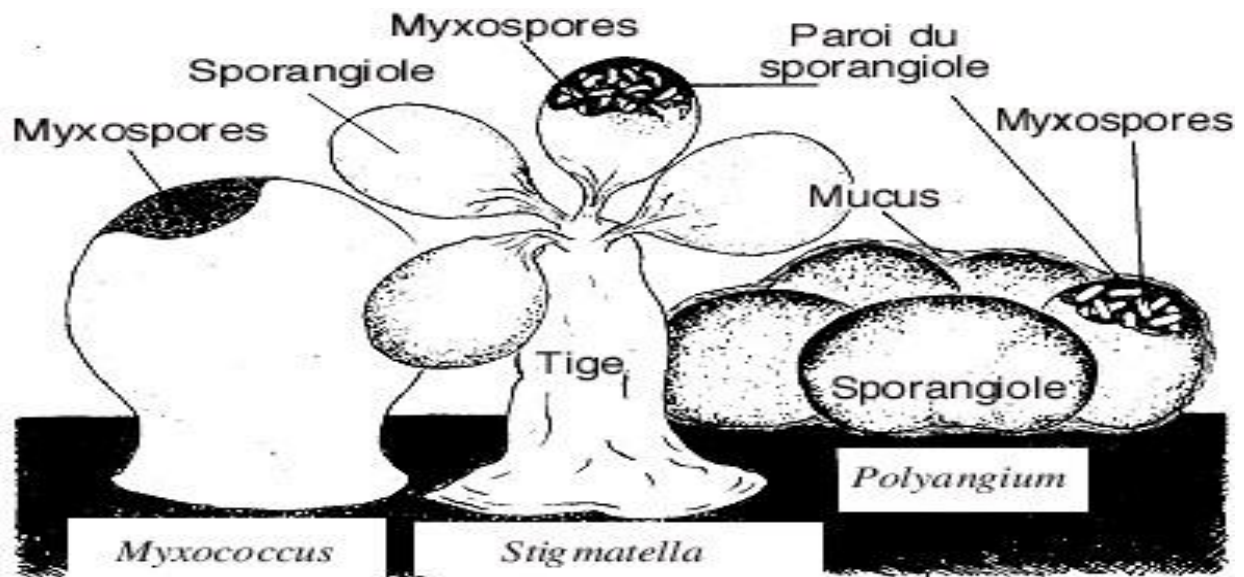
**Figure 03 :** Corps de fructification de *M. xanthus*

### I -8-1 Corps de fructification de *M. xanthus* :

L'exemple le plus frappant de coopération chez les myxobactéries est peut-être le développement du corps de fructification . En cas de famine, *M. xanthus* entre dans un programme de développement et forme des fructifications multicellulaires, au sein desquelles les cellules se différencient en spores (**Dworkin ,1996**) . La morphologie du corps de fructification va des monticules relativement simples trouvés chez *M. xanthus* à des structures arborescentes élaborées de *Chondromyces crocatus* ( **Shimket ,1990**) .Après la famine, les cellules individuelles de *M. xanthus* s'organisent en de simples agrégats qui se développent en monticules en forme de dôme contenant environ 100 000 cellules coopérantes . En plus de la formation de monticules, des comportements d'ondulation peuvent également être observés dans certaines zones au cours du stade de développement précoce (appelé phase d'agrégation) (**Kaiser ,2003**) . Il a été suggéré que ces ondes progressives transportent des piles de cellules qui entrent en collision les unes avec les autres et forment des « embouteillages ». Ces masses de cellules pénètrent dans le monticule de différentes directions et sont supposées se coincer dans les embâcles, ce qui conduit à la formation d'agrégats (**Kuner ,1982**) . Après la phase d'agrégation, la sporulation se poursuit et une petite fraction des cellules se différencie en spores dormantes sphériques ( **Lee, Holkenbrink et al ,2012**). Les cellules restantes de la population se différencient en bâtonnets périphériques (cellules de type persistance) ou se lysent . Le développement est également un comportement dépendant de la densité cellulaire chez *M. xanthus* (**Kaiser ,2006**). Les cellules sporulent moins efficacement, voire pas du tout, si leur densité est inférieure à une concentration seuil (**Plamann ,1996**).

L'agrégation cellulaire coordonnée dans les organes de fructification multicellulaires est régulée par la signalisation cellule-cellule. Au cours de l'initiation du développement, les cellules de *M. xanthus* accumulent des niveaux élevés de (p) ppGpp en réponse à la famine et produisent un signal A, un signal de type quorum extracellulaire censé surveiller la densité cellulaire locale (**Harris, Kaiser et al, 1998**). Une fois que le signal A extracellulaire dépasse le seuil minimum, garantissant qu'une population minimum (un quorum) de cellules affamées existe, l'expression de gènes spécifiques au développement régulés par le signal A est initiée (**Kuspa, Plamann et al ,1992**) . Une agrégation coopérative s'ensuit et la

pour suite de la morphogenèse dépend d'un autre signal, le signal C, qui est un morphogène qui nécessite un contact cellule-cellule pour son activité (**Shimket ,1999**). La nature du signal C n'est pas claire, bien qu'il ait été suggéré que la protéine CsgA puisse agir elle-même comme un morphogène ou comme une enzyme pour générer le signal C (**Avadhani, Geyer et al ,2006**). La transmission du signal C semble reposer sur des contacts de bout en bout entre les cellules ( **Kruse, Lobedanz et al , 2007**) et les fréquentes interactions cellule-cellule qui se produisent au sein d'agrégats à haute densité augmentent le niveau de signalisation C (**Jelsbak , 2000**). Un modèle suggère que la transmission du signal C fournit un indice de position pour réguler le mouvement directionnel des cellules . Ici, au cours de la phase d'agrégation, la signalisation C aide à recruter des cellules en chaînes via des interactions de pôle à pôle . Selon ce modèle, les cellules des champs désordonnés sont organisées en flux et se déplacent vers les centres d'agrégation avec une vitesse plus élevée et une fréquence d'inversion plus faible, par rapport aux cellules non recrutées . La densité cellulaire accrue au sein des agrégats fournit à son tour une rétroaction positive qui aide à augmenter le niveau de signalisation C jusqu'à ce qu'il atteigne le seuil requis pour la différenciation des spores (**Kaiser ,1991**) . Cependant, une étude plus récente a proposé un modèle différent, suggérant que la réduction de la vitesse cellulaire, plutôt que la suppression de l'inversion cellulaire, est responsable de la formation d'agrégats (**Sliusarenko, Zusman et al ,2007**). Ici, les cellules ralentissent et s'orientent en parallèle au sein d'agrégats à haute densité. Il a également été suggéré que différentes conditions expérimentales pourraient expliquer certaines des différentes observations trouvées au cours du développement (**Mauriello, Mignot et al ,2010**) .



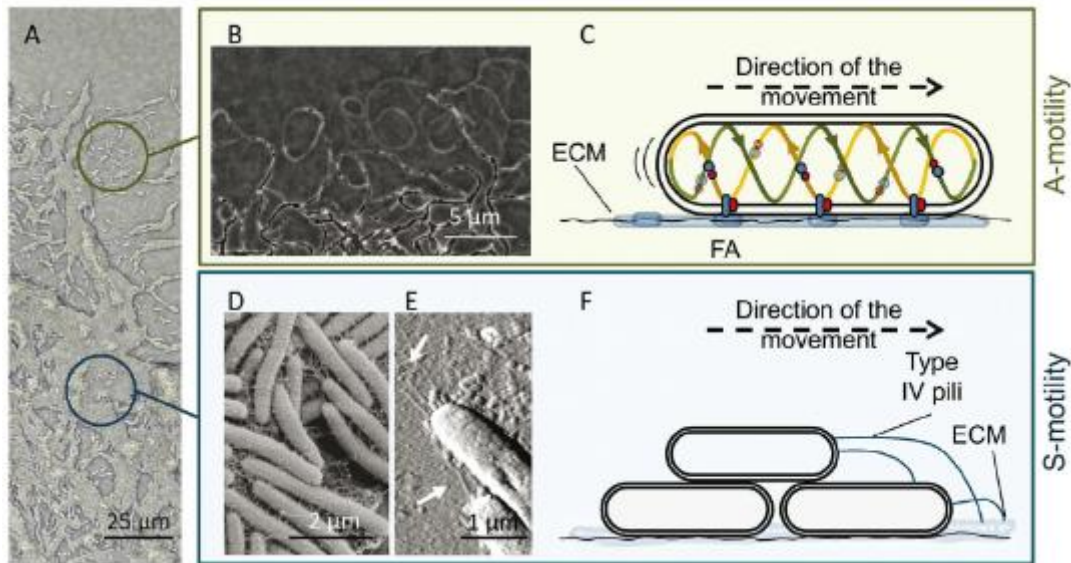
**Figure 04 :** Représentation schématique des fructifications de myxobactéries et de leurs composantes structurelles.

### I -8-2 Motilité :

Une autre caractéristique distinctive des myxobactéries - la motilité glissante – est définie comme la capacité de se déplacer sur des surfaces sans utiliser de flagelles. Cette caractéristique s'intègre bien dans la notion de sol et de végétation en tant qu'environnement typique pour les myxobactéries, où le mouvement à travers un liquide avec des flagelles a peu d'avantages pour ces organismes. Le glissement est également la caractéristique clé qui permet de chasser et de se nourrir d'organismes de proie dans le sol, il est également utilisé comme base pour l'isolement des myxobactéries. (Nudleman et Kaiser, 2004)

La motilité A (aventureuse) est associée à la sécrétion de boue, et les individus ont tendance à suivre les traces de boue tracées par les passants récents. Récemment, nous avons pu montrer que la poussée générée par la boue polyelectrolytique émergeant des buses aux pôles cellulaires pouvait expliquer la vitesse observée des mutants (Wolgemuth et al., 2002). La motilité S (sociale) est accomplie par l'extension, l'attachement et la rétraction des pili de type 4 (Nudleman et Kaiser, 2004). La rétraction est entraînée par un moteur hexamérique appelé PilT, qui peut générer ~120pN de force, le plus puissant de tous les

moteurs protéiques connus (Maier et al., 2002, 2004).



**Figure 05 :** la Motilité A et S de *M. xanthus*.

### I -8-3 Prédation :

On pense que la prédation par *M. xanthus* est médiée par la sécrétion d'hydrolases extracellulaires et d'antibiotiques, qui agissent alors sur les cellules proies voisines provoquant leur lyse. *M. xanthus* est capable de chasser diverses bactéries Gram négatives et Gram-positives, ainsi que des champignons, avec une portée et une efficacité prédatrices apparemment dépendantes de l'espèce et de la souche (Morgan et al , 2010; Pham et al , 2005; Rosenberg et Varon , 1984). De nombreuses activités enzymatiques de dégradation ont été identifiées dans les surnageants de culture myxobactérienne, notamment les activités de protéase, de lysozyme, d'amidase, de glucosaminidase et d'endopeptidase (Berleman et Kirby, 2009). La prédation par *M. xanthus* a souvent été comparée au comportement de chasse des meutes de loups, avec des groupes de cellules chassant leurs proies en coopération preuve.

Pour la prédation coopérative a été fourni en utilisant des cultures agitées contenant une source de nutriments protéiques (caséine). Le taux de croissance s'est avéré dépendre de la densité cellulaire, qui était en corrélation avec l'activité de la protéase dans le surnageant de culture (Rosenberg et al, 1977). Cela impliquait que la dégradation des macromolécules était



renforcée par des densités cellulaires élevées, indiquant un processus coopératif. Cependant, plus récemment, il a été démontré que des cellules individuelles de *M. xanthus* se livrent à une prédation efficace, ce qui suggère que la coopérativité n'est pas absolument requise pour la prédation (**McBride et Zusman, 1996**), bien qu'elle puisse améliorer l'efficacité de la prédation dans certaines situations.

# **Métabolites secondaires des Myxobactéries**

## II-1- Généralités sur les antibiotiques :

### II-1-1- définition :

Le mot « antibiotique » a été proposé la première fois par Sleman Waksman, un pionnier du criblage des sols et découvreur de la streptomycine (Davies, 2010). Sa définition se basait sur l'application d'un composé chimique, par exemple, son utilité ou un effet de laboratoire.

le terme « antibiotique » a été interprété de multiples façons, cependant la définition la mieux acceptée est un composé d'origine biologique qui a le pouvoir d'inhiber ou de tuer des microorganismes en interagissant spécifiquement avec leur cible, sans égard pour la classe ou l'origine du composé (Davies, 2010)

Le premier d'entre eux (la pénicilline) a été découvert en 1928 par Alexander Fleming, au hasard chez le champignon *Penicillium glaucum*, et utilisé à partir des années 1940. Depuis cette date, de nombreux antibiotiques ont été découverts (Lesseur, 2014). Ils peuvent être produits de manière naturelle par des champignons et des bactéries ou obtenus par synthèse et héli-synthèse.

Lorsqu'un antibiotique a la capacité d'induire la mort cellulaire, celui-ci est décrit comme étant bactéricide. D'autre part, un antibiotique qui peut seulement inhiber la croissance cellulaire est considéré comme bactériostatique (Kohanski et al., 2007)

### II -1-2- Critères de Classification

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

- 1 Origine : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)
- 2 Mode d'action : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques
- 3 Spectre d'activité : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)
- 4 Nature chimique : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base

(ex : cycle  $\beta$  lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse. La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles ( $\beta$  lactamines, aminosides ,tétracyclines.....etc.)

Nous adopterons la classification selon le mode d'action ( **auckenthaler ; 2003**)

## **II -1-3- Mode d'action**

Les antibiotiques agissent de façon très spécifique sur certains structures de la cellule bactérienne cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs a très faible concentration . cette action s'exerce selon les molécules sur les sites variés

(**mévius et al 1999. Oxoby 2001** )

Les antibiotiques peuvent agir sur :

### **II -1-3-1 La paroi bactérienne :**

péniciline et les ciphalosporines agissent sur les germes en croissance inhibes la dernière étape de la biosynthèse de peptidoglycane( murienne un composant essentiel de la paroi bactérienne qui confère a la bacterie sa rigidité ce qui lui permet de résister a la forte pression osmotique intra cytoplasmique ) au cours de la multiplication cellulaire . la nouvelle bacterie n'est plus protégé entraînant ainsi une lyse

bactérienne ( **zeba , 2005** )

### **II -1-3-2 La membrane cellulaire :**

désorganisant sa structure et son fonctionnement ce qui produit des graves troubles d'échanges hydrolitiques avec le milieu extérieur .

### **II -1-3-3 ADN :**

certaines familles d'antibiotiques qui empêchent la répllication d'adn en bloquant la progression de l'adn polymérase. L'actinomycine bloque la progression de l'ARN polymérase les sulfamides provoquent une inhibition de la synthèse de la base nucléiques et la cellule meurt par une carence en bases nucleiques ( **flandrous et al ; 1997** ) . les quinolones at les fluoroquinolones inhibent l'adn gyrase ( **chopra ; 1998**)

### II -1-3-4 Le ribosome bactérien :

sur les ribosomes ce qui entraîne l'arrêt de biosynthèse des protéines ou la formation de protéine anormales, les aminoglycosides ou les aminosides (streptomycine, gentamycine) empêchent la traduction de l'ARN en se fixant sur la petite sous-unité de ribosome (herman ; 2005), les phénicoles (chloramphénicole, thaimphénicole) bloquent la formation de la liaison peptidique sur la grosse sous-unité du ribosome bactérien. Les cyclines (tétracyclines, doxycyclines) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique en se fixant sur la petite sous-unité (flandroy et al ; 1997), les macrolides et les kétolides (erythromycine, azithromycine) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique (nilius et al ; 2002)

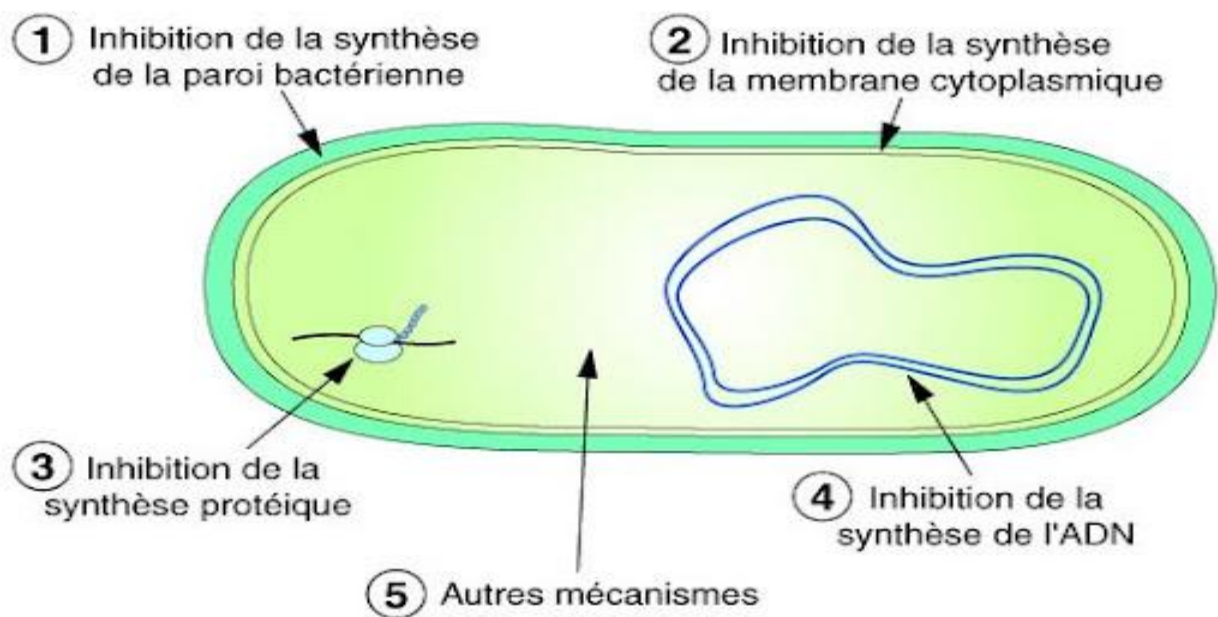


Figure 06 : le mode d'action des antibiotiques

### II -1-4-Les catégories des antibiotiques :

**II -1-4-1 Les antibiotiques à spectre étroit :** ils ne tuent qu'un nombre limité de bactéries.

Ils peuvent cibler et tuer les bactéries à l'origine de la maladie tout en laissant en vie les autres bactéries, qui peuvent être bénéfiques.

Ces antibiotiques sont habituellement prescrits lorsque la bactérie à l'origine de l'infection

est exactement connue. ( Pascale 2014) .

**II -1-4- 2 Les antibiotiques à spectre large :** ils sont efficaces contre de nombreuses bactéries, y compris certaines bactéries résistantes aux antibiotiques à spectre étroit.

Ce type d'antibiotique est prescrit lorsque l'on ne connaît pas exactement quelle est la bactérie à l'origine de l'infection ou lorsque la maladie est causée par plusieurs bactéries différentes. (Perry et al, 2004).

## **II -2- l'activité antimicrobienne des myxobactéries :**

Les myxobactéries sont l'une des sources importantes de produits microbiens naturels.

Les principaux producteurs de métabolites secondaires sont les membres d'*Actinomyces* (environ 8000 composés caractérisés), le genre *Bacillus* (1400), ainsi que *Pseudomonas* (400).

Cependant, au cours de la dernière décennie, les myxobactéries sont apparues comme une source alternative prometteuse de molécules bioactives (Huang et al ;2012)

Les myxobactéries produisent une vaste gamme de produits naturels structurellement divers avec des propriétés biologiques importantes : des antibiotiques , des enzymes , des antifongiques .

L'observation des composés actifs antimicrobiens produits par les myxobactéries a commencé en 1947. Le composé, 1-hydroxy-6méthoxyphénazine-N5, N10-dioxyde (myxine) a été rapporté comme l'un des premiers composés antibiotiquement actifs d'une espèce de *Sorangium*, (Schäberle et al, 2014).

### **II -2-1-Les inhibiteurs ADN polymérase bactérienne**

L'ARN polymérase bactérienne est une cible établie pour antibiotiques.C'est une enzyme essentielle et bien adaptée à l'attaque des antibiotiques, car les sous-unités bactériennes sont hautement conservés.et pour la survie des bactéries

À ce jour, quatre antibiotiques et leurs dérivés correspondants sont connus à partir de

myxobactéries, qui inhibent les ADN polymérase bactérienne : corallopyronine A, la myxopyronine A, la ripostatine A, et sorangicine A

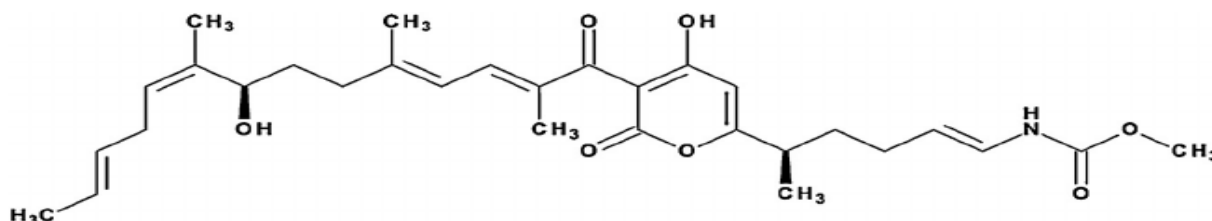
## II -2-1-1-Corallopyronine

Les corallopyronines ont été isolées pour la première fois en 1985 à partir d'un *myxobacterium Corallococcus coralloides* de Tunisie , un antibiotique possédant un groupement  $\alpha$  pyrone , il existe 3 types des corallopyronines ( A.B.C) (**Irschik et al, 1985**).

### II-2-1-1-1 : L'activité antimicrobienne :

- La corallopyronine A a été testée sur une série de micro-organismes et a montré une activité prometteuse contre Bactéries à Gram positif avec des valeurs MIC de l'ordre de 0,097mg mL<sup>-1</sup> (*Staphylococcus aureus*) et 0,39 mg mL<sup>-1</sup> (*Bacillus mégaterium*)
- La corallopyronine B était moins active dans le même système de test avec des valeurs MIC de 0,39 mg mL<sup>-1</sup> (*S. aureus*) et 3,1 mg mL<sup>-1</sup> (*B. megaterium*), respectivement. Corallopyronine C (CMI respectives 0,78 et 6,25 mg mL<sup>-1</sup> ) (**Benabad, 2017**).

La corallopyronine est essentiellement active contre les bactéries à Gram positif .



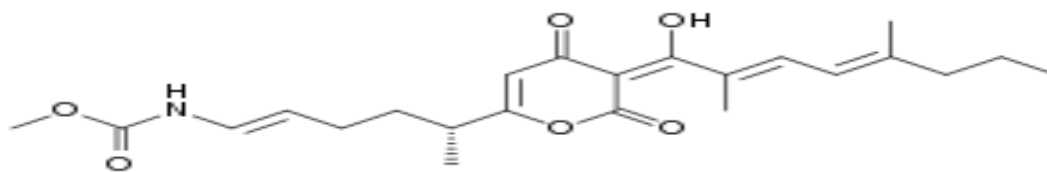
**Figure 07** : La structure chimique de Corallopyronine (**Weissman et Muller, 2010**).

## II -2-1-2-Myxopyronine

Cet antibiotique est produit par *Myxobacterium Myxococcus fulvus*. Elle est structurellement proche des Corallopyronine, mais elle en diffère par la possession d'une extension de chaînes de sept carbones. (**Irschik et al, 1983**), dans les années 1980, aucune des activités du myxopyronines, n'a été observée contre *Mycobactérie phlei*.

Cet antibiotique a une forte activité antibactérienne contre un large spectre de bactéries à Gram-positif, y compris *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus*

*faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis*, et *Bacillus anthracis*. (Benabad, 2017).



**Figure 08** : La structure chimique de Myxopyronine (Schäberle et al, 2014).

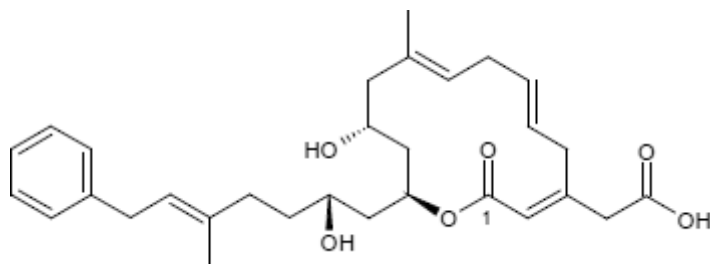
### II-2-1-2-1 L'Activité antimicrobienne :

Le mode d'action de ces produits a été déterminé en étudiant les protéines, l'ARN et l'ADN synthèses dans des cellules de *S. aureus* traitées aux antibiotiques en ajoutant le précurseurs radioactifs [U-14C] leucine, ou [2-14C] uracile, ou [U-14C] thymidine. Le résultat de ces expériences d'incorporation a montré que l'incorporation de la thymidine n'était pas affectée. Squelette de pyridyl-benzamide<sup>38</sup> ou dérivés dits de squaramide<sup>39</sup> qui sont structurellement complètement différents du produit naturel respectif. Tous les composés synthétisés qui ont été trouvés sur la base de cette approche sont considérablement moins actifs que les produits naturels (Schmitz ;2013).

### II-2-1-2-La ripostatine

La ripostatine A–C a été isolée de *Sorangium cellulosum*. La ripostatine A et B ont 14 chaînons macrolides avec trois doubles liaisons en position 2,5,8, alors que la ripostatine C est un dérivé non cyclisé. Toutes les ripostatines ont un cycle phényle terminal. Ripostatine A, qui se produit dans une solution méthanolique sous forme de mélange des formes cétone (7a) et hémicétal (7b) peut être transformée chimiquement en la forme B par réduction, et en forme C par élimination catalysée par une base (Srivastava ;2011)





**Figure 09 :** La structure chimique des Ripostatines (Schäberle et al, 2014).

### II-2-1-2-1- L'activité antibactérienne

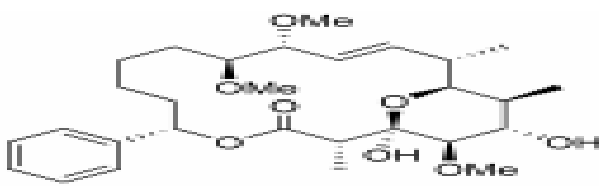
Presque la même activité antimicrobienne contre certains Des bactéries à Gram positif, principalement des souches de *S. aureus*, et envers *E.coli* avec des CMI de l'ordre d'environ 1 mg mL<sup>-1</sup>

Ripostatine B a montré en outre une activité mineure contre plusieurs levures et les champignons (CMI 20 mg mL<sup>-1</sup> contre *Nadsonia fulvescens* et 80 mg mL<sup>-1</sup> contre *Debaryomyces hansenii*, respectivement) ( Kaur et al, 2018).

### II-2-1-3-Sorangicine

Les antibiotiques sorangicines, comme les ripostatines, sont également originaires d'une souche myxobactérienne du genre *Sorangium*

D'autres isomères de la sorangicine ont été rapportées (A1, A2, A3, C1, C2, C3, C4), la structure de base comprend une grande hydroxylactone macrocyclique (Smith ; 2009)



**Figure 10 :** structure chimique de Sorangicine

#### II-2-1-3-1 L'activité antibactérienne :

la sorangicine A et B, la plus métabolites abondants, ont montré de forts effets inhibiteurs principalement contre les bactéries Gram-positives, y compris mycobactéries, avec des valeurs de CMI à partir de 0,01 mg mL<sup>-1</sup>.

À des concentrations plus élevées, également des bactéries Gram-négatives ont été inhibés. CMI pour *E. coli* était de 16 mg mL (Benabad, 2017).

## II -2-2 Les inhibiteurs de la synthèse des protéines :

Les ribosomes jouent un rôle clé dans tous les organismes vivants, y compris microbes, et en raison de différences distinctes dans leurs molécules représentent une cible importante pour les agents antibactériens. Un grand nombre d'antibiotiques cliniquement utiles, par ex. aminosides et tétracyclines, ciblent cette machinerie complexe responsable de la synthèse des protéines. Quelques métabolites mycobactériens ont été identifiés, ce qui interfère avec cette machinerie ribonucléoprotéique.

### II -2-2 -1 Althiomycine :

L'antibiotique soufré althiomycine a été le premier isolé en 1957 à partir d'une souche de *Streptomyces althoticus* 69. les membres du genre mycobactérien *Cystobacter* et *Myxococcus* sont également producteurs de ce composé<sup>70</sup>

Le principal des caractéristiques chimiques sont un groupe oxime, un thiazole, thiazoline et un cycle méthoxypyrrolin ( Gere ;2012 )



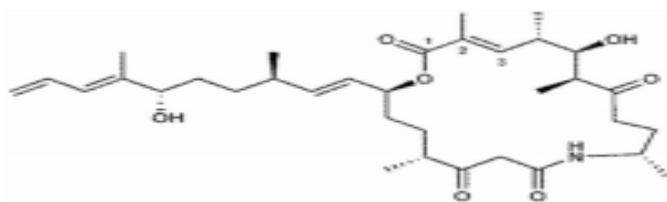
**Figure 11** : La structure chimique de l'althimicyne( Weissman et Muller, 2010).

### II -2-2 -1 -1 L'activité antibactérienne:

Althiomycine a montré une activité antibiotique contre plusieurs Gram-négatifs et-bactéries positives, par ex. une CMI de 6,3 mg mL<sup>1</sup> contre *Klebsiella pneumoniae*, de 1 mg mL<sup>1</sup> contre *E. coli* 1852E PM, de 16 mg mL<sup>1</sup> contre *S. aureus* 853E, et de 0,8 mg mL<sup>1</sup> contre *Corynebacterium diphtheriae* a été observée.( Inami ;1986)

## II -2- 2 - 2 Angiolame

L'Angiolame A est un antibiotique lactam-lactone d'*Angiococcus disciformis* (Kunze et al, 1985). Il était actif contre certains membres des bacillacées à Gram positif, y compris les anaérobies ; *Clostridium perfringens*. Les bactéries à Gram négatif étaient en général résistantes, à l'exception des mutants d'*E. coli* avec une perméabilité accrue (Schäberle et al, 2014).



**Figure 12 :** La structure chimique de Angiolame

## II -2-2 -3 Myxovalargines

Myxovalargines A (17) et les dérivés myxovalargines B et C ont été obtenus à partir de la souche de *Myxococcus fulvus*. Ces les composés sont des peptides linéaires constitués de 14 acides aminés (Schäberle et al, 2014).

### II -2-2 -3-1 Activité antibactérienne:

Il agit en perturbant la liaison de l' aminoacyl-ARNt au site A. Il endommage également la membrane cellulaire de nombreuses bactéries (Kaur et al, 2018).

## II -2-3 Inhibiteurs de la respiration :

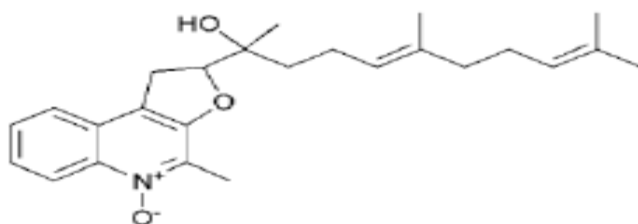
Deux métabolites myxobactériens actifs sur le plan antibiotique ont été trouvés qui ciblent la chaîne respiratoire, c'est-à-dire les aurachines et les thuggacines. Les enzymes de la chaîne respiratoire ne représentent pas un cible en antibiothérapie, car ces protéines sont hautement conservé dans tous les organismes. Par conséquent, le risque de toxicité est haut.

### II -2-3-1 Les aurachines

Les aurachines ont été isolés du myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. ont été isolés du

myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*.

Les trois principaux métabolites ont été nommés aurachine A (18), B (19) et C (20), tandis que D (21) et E (22) sont des produits mineurs. Tous ces composés partagent le noyau quinoléine, dans certains cas l'azote étant présent sous forme de N-oxyde, donc chimiquement sont des quinolones (Oettmeier et al, 1990).



**Figure 13** : La structure chimique d'aurachines (Weissman et Muller, 2010).

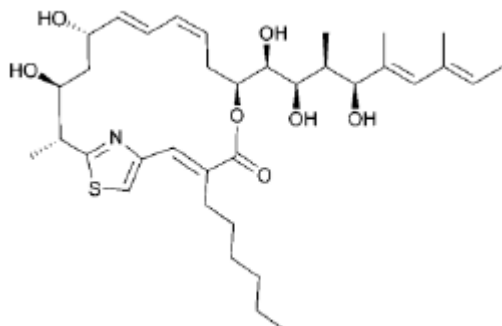
### II -2-3-1 -1 Activité antibactérienne

Comme la plupart des antibiotiques myxobactériens, les aurachines étaient actives contre de nombreuses bactéries Gram-positives, par ex. CMI contre *B. subtilis* étaient pour l'aurachine A : 5 mg mL<sup>-1</sup>, aurachine B : 2,5 mg mL<sup>-1</sup>, aurachine C : 0,15 mg mL<sup>-1</sup>, et aurachine D : 0,15 mg mL<sup>-1</sup>, une inhibition faible mais incomplète des champignons a été trouvée par exemple La CMI de l'aurachine A était de 50 mg mL<sup>-1</sup> contre *Debaryomyces hansenii* et *Saccharomyces cerevisiae*

Les aurachines Ils ont bloqué l'oxydation du NADH. (Kunze et al, 1987).

### II -2-3-2 Thuggacine :

Trois macrolides contenant du thiazole ont été isolés dans 2007 de la souche *Sorangium cellulosum* En raison de leur d'origine ils ont été nommés Soce-thuggacin A, B et C (parfois, mais seulement nommés thuggacine) ( Buntin et al, 2010).



**Figure 14** : La structure chimique de thuggacine (Schmitz et al, 2013).

## II -2-3-2-2 L'Activité antibactérienne :

la thuggacine A a montré une activité inhibitrice contre les bactéries Gram positives comme *Micrococcus luteus* (MIC 3 mg mL<sup>-1</sup>) . et contre plusieurs mycobactéries, comme *Mycobacterium phlei* dont CM était de 0,03 mg . et *M. tuberculosis* 8,0 mg mL<sup>-1</sup>

## II -2-4 Inhibiteurs de la formation de biofilms :

Les bactéries présentes sous forme de biofilm donnent une résistance élevée aux antibiotiques par rapport à leurs homologues vivant en liberté. les raisons potentielles de cette résistance accrue sont que les antimicrobiens ne peuvent pas pénétrer leur barrière, et que de nombreuses cellules sont métaboliquement inactives. Il s'agit donc d'intérêt particulier pour trouver des antibiotiques actifs contre les biofilms

### II -2-4 -1 Carolactone

Carolactone a été isolé en 1998 par Hofl de *Sorangium cellulosum*. Les caractéristiques structurales sont un cycle lactone à 12 chaînons avec deux fonctions hydroxyles secondaires en C-17 et C-18, et un groupe carboxyle terminal sur la chaîne latérale. Il appartient à famille des macrolides (Sugathan et al, 2017).

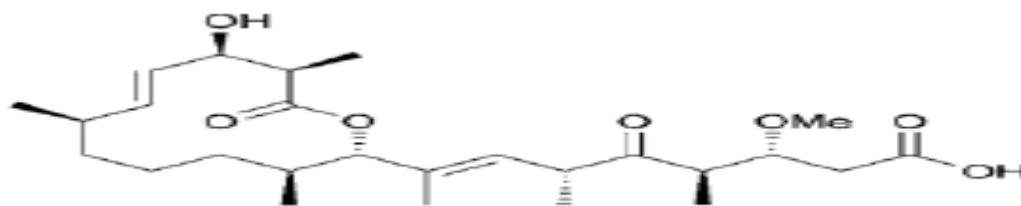


Figure 15: La structure chimique de Carolactone (Schmitz et al, 2013).

## II -2-4 -1-1 L'activité antibactérienne

La Carolactone présente une activité inhibitrice contre la souche bactérienne gram-négative *E. coli tolC* ainsi qu'une action perturbatrice sur les biofilms bactériens. Il a montré une activité prometteuse contre la formation de caries dentaires et d'endocardite causée par *Streptococcus mutans* (Sugathan et al, 2017).

## II -2-4 -2 Myxovirescine :

La famille des myxovirescines est représentée par des antibiotiques étroitement apparentés produits par de nombreuses espèces myxobactérienne. Le premier isolement a été fait de *Myxococcus virescens*

La structure de base de cette molécule est un cycle à 28 chaînons, avec une lactone et un fonctionnalité lactame. la myxovirescine (30) est également nommé antibiotique TA (Takayama, 2013)

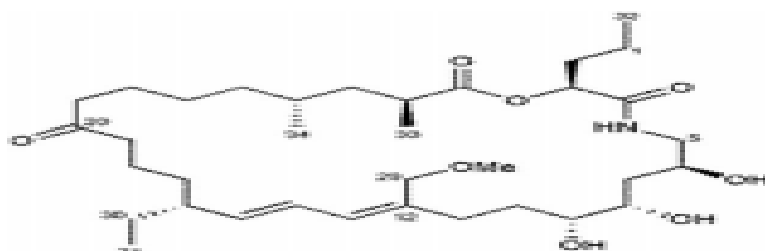


Figure 16 : La structure chimique Myxovirescine (Schmitz et al, 2013).

## II -2-4 -2 -1 L'activité antibactérienne

Le premier l'évaluation antimicrobienne de la myxovirescine A1 a montré un CMI de 1 mg mL<sup>-1</sup> contre *E. coli*, alors que Gram-négatif *P. aeruginosa*, ainsi que *S. aureus* à Gram positif

et *B. megaterium* ont été affectés avec simplement une CMI de 30 mg mL<sup>-1</sup>. Dans un essai de diffusion sur gélose, en utilisant les souches susmentionnées, seul *E. coli* a montré un halo d'inhibition. En revanche, d'autres rapports ont déclaré que toutes les souches de *Bacillus* se sont révélées très sensibles vers l'antibiotique (CMI 0,1–5 mg mL<sup>-1</sup>), ainsi que les souches de *Pseudomonas* et *Staphylococcus* (CMI 5-25 mg mL<sup>-1</sup>) (Sugathan et al, 2017).

## II -2-5- Antibiotiques d'origine marine Myxobactérie :

Les expériences sur les espèces myxobactériennes marines n'ont commencé que récemment, en raison du fait que ces organismes sont encore difficiles à cultiver et à croissance lente. Cependant, en 2013, certaines substances actives sur le plan antibiotique ont été isolées à partir de myxobactéries marines. Salimyxine B et enhygrolide A d'*Enhygromyxa salina*, ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis des cristallobactéries non pathogènes d'*Arthrobacter* avec Valeurs MIC de 8 et 4 mg mL<sup>-1</sup>, respectivement. Un autre composé isolé par Felder et al. appelé salimabromure (Apel, 2013), (présent uniquement dans la souche SWB007) possède un nouveau squelette carboné, composé de quatre cycles dont un fortement bromé un cycle benzénique, un résidu furanolactone et un cycle cyclohexane, ponté par un fragment cyclique à sept chaînons. L'antibiotique

## II -3 Activité enzymatiques des myxobactéries

les enzymes produits par les myxobactéries tuent les micro-organismes et lysent les cellules. La dégradation de la paroi cellulaire, les lipases, les nucléases, les polysaccharidases et les protéases semblent être impliquées dans la lyse des microbes proies ainsi que dans l'autolyse ou la mort cellulaire programmée (Alvarez-Sieiro et al. 2014).

les myxobactéries sont divisées en deux groupes :

- 1-bactériolytique : lysant les cellules vivantes d'autres micro-organismes
- 2- cellulolytique : décomposant la cellulose (Reichenbach et Dworkin ;1992)

enzymes cellulolytiques sont organisées en deux stratégies, les enzymes libres extracellulaires et les enzymes complexes liées aux cellules (Hou et al. 2006)

Activité cellulolytique chez les myxobactéries *Sorangium* sp. est plutôt faible par rapport à

celle des cellulases libres extracellulaires dans les champignons cellulolytiques aérobies tels que *Penicillium*, *Aspergillus* (**Brzezińska ; 2012**). les cellulases de *Sorangium* existent sur les surfaces cellulaires et sont organisées en un complexe, qui pourrait être des protubérances cellulaires. Enzymes cellulolytiques dans *Sorangium* sont arrangés en un complexe de 1000 à 2000 kDa, qui contient au moins des activités cellulase et xylanase (**Hou et al, 2006**)

Les lipides jouent un rôle central dans le cycle de vie de *Myxococcus* pendant la prédation et le développement (**Moraleda-Muñoz et Shimkets 2007**)

Les acides gras sont utilisés pour le carbone et l'énergie pendant la croissance, ainsi que les protéines qui sont enfermées dans le cytoplasme de la proie. *M. xanthus* enlever la barrière membranaire avec des enzymes lipolytiques qui non seulement libèrent des acides gras, mais vident également le contenu cytoplasmique de la proie (**Curtis et al. 2006**).

les myxobactéries ont produit des protéases alcalines et acides extracellulaire (**Brzezińska 2012**) Les enzymes protéolytiques sont produites à la fois par les myxobactéries cellulolytiques (par exemple, les membres du genre *Sorangium*), ainsi que par les prédateurs (par exemple, appartenant au genre *Myxococcus*) (**Kim et al. 2009**).

fonctions possibles pour les protéases extracellulaires myxobactériennes :

- 1- protéases peuvent fournir des acides aminés aux myxobactéries en hydrolysant les protéines du sol dérivées de micro-organismes végétaux, animaux et du sol
- 2- protéase peut perturber la membrane cellulaire de l'eubactérie, libérant son contenu intracellulaire accessible au milieu environnant, après activité des enzymes lytiques de la paroi cellulaire
- 3- protéase la lyse ultime de la proie (**Gnospelius ; 1978**)

il existe une enzyme produite par *Myxococcus xanthus*, nommée ArsA, présentait une faible activité de phosphatase vis-à-vis du p-nitrophényl phosphate et une activité élevée d'arséniate réductase, ce qui indique qu'elle peut réduire les arséniate dans des conditions naturelles



(kim et al ;2009)

## II -4 l'activité anticancéreuse des myxobactéries :

### II -4 -1 l'Epothilone :

Un exemple d'un intérêt particulier est l'épothilone de *Sorangium cellulosum*. L'épothilone inhibe la dépolymérisation microtubules et est active contre les lignées cellulaires cancéreuses multirésistantes et les tumeurs, par l'inhibition de la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose. (Schäberle et al 2014).

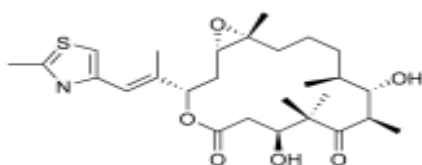


Figure 17 : la structure chimique de l'Epothilone

### II -4 -2 Ixabepilone :

Est un analogue d'épothilone est un agent de chimiothérapie approuvé par la Food and Drug Administration des États-Unis pour le traitement du cancer du sein métastatique (Schmitz et al. 2013)

## II -5 Activité antifongique :

Les antifongiques ou fongicides sont des médicaments possédant la capacité de traiter les mycoses, c'est à dire des infections causés par des champignons microscopiques et levures

La plupart des métabolites myxobactériens sont des polycétides (PK) ou des peptides non ribosomiques, ou des hybrides des deux classes structurales, et ils contiennent souvent des fonctionnalités que l'on trouve rarement dans d'autres produits naturels (Wenzel et Müller, 2007)

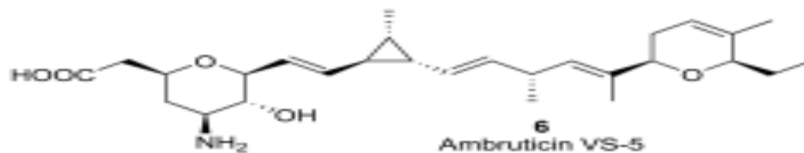
Le genre *Sorangium* produit près de la moitié des métabolites secondaires isolés des myxobactéries. Comme les antifongiques :

### II -5 -1 Icumazoles

Icumazoles ont été décrits comme une nouvelle classe d'antifongiques de *Sorangium cellulosum* (Barbier et al. 2012)

**II -5 -2 ambruticine :**

il existe plusieurs antifongiques composés de faible toxicité (par ex. ambruticine ). Bon activité de l'ambruticine contre les mycoses systémiques, difficiles à traiter.

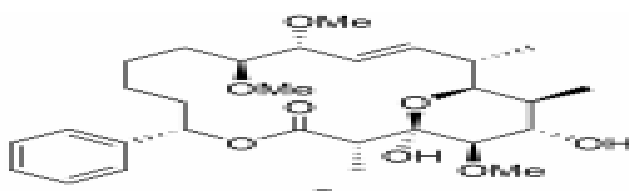


**Figure 18 :** La structure chimique de ambruticine

**II -5 -3 Soraphène :**

Son activité antifongique a été détectée dans le bouillon de culture de *Sorangium cellulosum* (Myxococcales), souche So ce26. L'activité a été excrétée dans le surnageant pendant la phase logarithmique et la phase stationnaire précoce.

Il présente un intérêt particulier pour la lutte contre les maladies des plantes en raison de son activité inhibitrice contre de nombreux champignons phytopathogènes. (Fleta-Soriano et al. 2014)



**Figure 19 :** La structure chimique de Soraphène

# **Techniques d'études**

### **III-1 Objectif :**

L'objectif principal de notre travail consiste à établir d'une méthodologie d'étude sur la base des travaux déjà réalisés dans ce domaine , donc on a fait une étude comparative.

### **III-2 Echantillonnage :**

Pour l'échantillonnage, en basant sur les observations de Reichenbach et Dworkin (1992), qui disent que les meilleurs les résultats d'isolement et de rendement en myxobactéries sont des données par les sols riches en organismes supérieurs.

Le prélèvement des échantillons est effectué selon la méthode de **Reichenbach et Dworkin (1992)**. En effet les cinq premiers centimètres du sol sont écartés à l'aide d'une spatule, après les échantillons sont prélevés puis placés sur une feuille d'aluminium

### **III-3 Le traitement :**

#### **III-3-1- Séchage**

Les échantillons doivent être séchés à température ambiante pour les formes végétatives des microorganismes pour éviter toute sortes d'altération (**Reichenbach et Dworkin, 1992**) .

#### **III-3-2- Tamisage**

Il est effectué à l'aide d'un tamis avec des pores de 250µm de diamètre pour éliminer les gros granules, ainsi que les débris des végétaux .

### **III-4 Méthodes d'isolement**

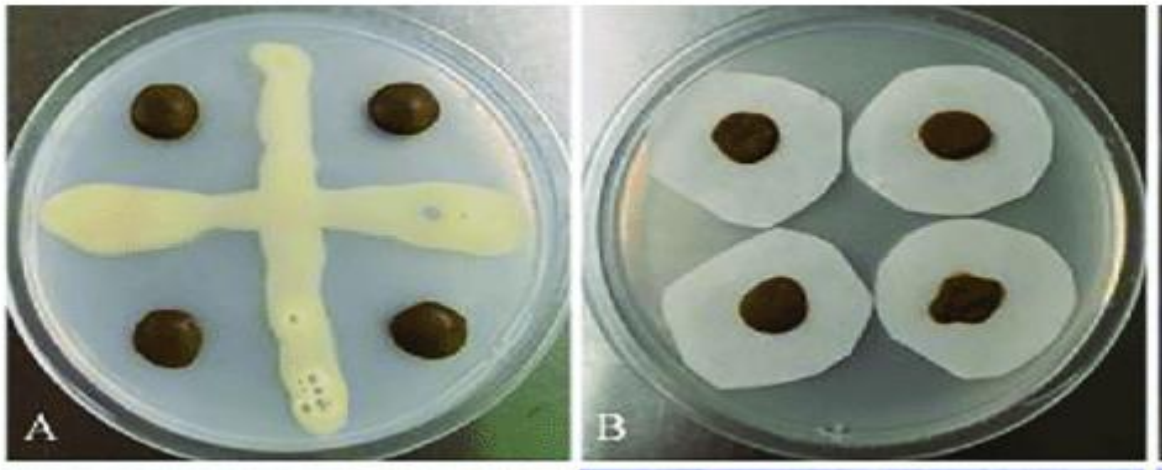
#### **III-4 -1 isolement à l'aide de papier filtre:**

Pour l'isolement des myxobactéries cellulolytiques , le milieu minéral ST21 est utilisé avec la cellulose comme seule source de carbone (**Shimkets et al.,2006**) . En effet, la cellulose est utilisée sous la forme de petits morceaux de papier filtre autoclavés (Whatman 1cm<sup>2</sup>), qui sont appliqués à la surface de gelée à raison de 3 à 4 morceaux par boîte.

Sur chaque morceau une e petite quantité de sol sec est placé . L'incubation se fait à 30 C°

(Mohr et al, 2016).

Le milieu ST21 est préparé à partir de deux solutions minérales A et B qui sont autoclavées séparément, puis combinées après stérilisation. A ce mélange, 1 ml de solution d'oligoéléments est additionné. Le pH de chaque solution est ajusté à 7,2 avant la stérilisation. Le milieu est supplémenté de fongicide Cycloheximi de 50 mg/l afin d'inhiber la croissance des champignons (Mohr et al., 2016) .



**Figure 20** : Isolement des mycobactéries à l'aide d'*E. coli* (A) et de papiers filtres (B).

### III-4-2 Isolement du sol par appâtage à l'aide des stries *Escherichia coli* :

Après autoclavage du milieu (WCX). Ajouter un antifongique cycloheximide (25 µg/100ml d'eau distillée stérile) pour limiter la croissance des champignons, puis répartir le milieu dans les boîtes de Pétri.

*E. coli* vivants sont inoculés de manière croisée à la surface de la gelée de cycloheximide (WCX). Le centre traversé a été inoculé avec de la terre de la taille d'un pois et trempé dans

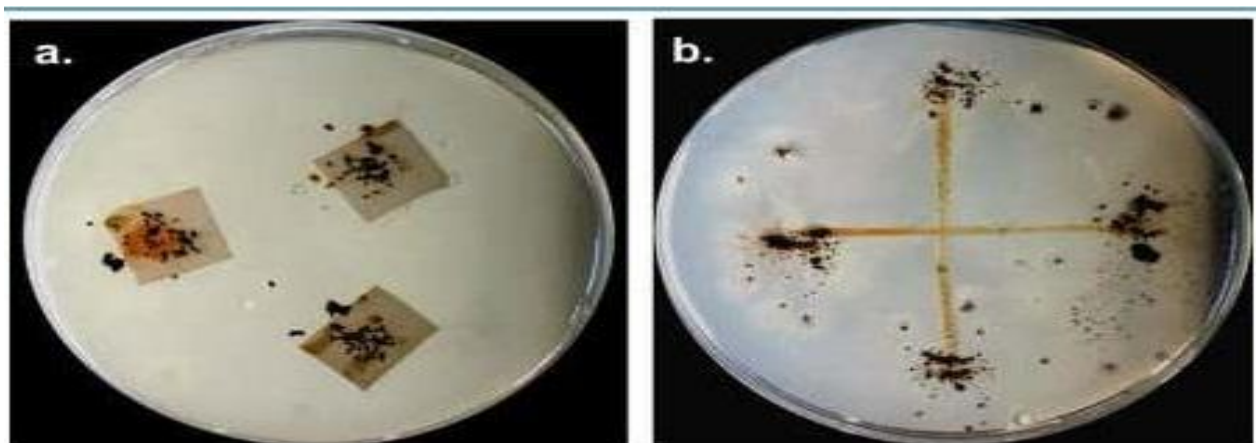
de l'eau distillée de manière aseptique. Incuber la boîte de Pétri à 30°C, vérifier la colonie, les colonies et les fructifications après 1-4 semaines d'incubation (Zhang et al, 2013).

### III-4 -3 Isolement à l'aide des séquences d'*E.coli* :

on savait que la plupart myxobactéries sont des microprédateurs c'est-à-dire qu'elles se nourrissent par la lyse des autres microorganismes, donc pour les isoler le milieu Eau-agar est utilisé avec *E. coli* vivant .

Après avoir ajusté le pH à 7,2 et stérilisé, ajouter 1 ml de solution de vitamine et de cycloheximide (50 mg/L) au milieu. *E. coli* vivant a été inoculé à la surface du milieu gélosé à l'eau sous forme croisée avec une pipette Pasteur (figure 21 ) .

Placez une petite quantité de terre sèche sur les quatre extrémités de la croix Incuber ensuite boîte de Pétri à 30°C (Mohr et al., 2016).



**Figure 21** : Méthodes d'isolement des myxobacteries à partir du sol

a : méthode de papier filtre; b : méthode de proie bactérienne (*E.coli* vivant)

### **III -4 -4 Isolement du sol par appâtage avec des granulés de fumier :**

Les myxobactéries dans les sols ont été isolées comme suit. Le sol a été placé dans une boîte de Pétri (environ 80-100 mm de diamètre) à une profondeur de 10-15 mm, et humidifié par pulvérisation d'eau stérile. Les crottes de lapin ont été stérilisées à la vapeur (100°C, 10 min), immergées dans une solution d'actidione (2,5 mg/100 ml) pour stériliser instantanément les moisissures, puis déposées sur le sol (**Reichenbach et Dworkin, 1992**). .

Pour l'isolement, les boîtes sont vérifiées régulièrement à partir du troisième jour, par une loupe binoculaire Gx20 et Gx40, pour la formation des corps de fructification.

### **III -5 Purification :**

Une petite partie des fructifications a été grattée avec une aiguille en platine et transférée sur un milieu gélosé CY (**Reichenbach et Dworkin , 1992**) . . Lorsqu'une fructification était de type rigide, elle était transférée dans une solution saline avec des billes de verre (environ 1 mm de diamètre) dans un tube à essai, et macérée avec un mélangeur.

La suspension ainsi obtenue a été étalée sur le milieu gélosé SP modifié Les plaquesensemencées ont été incubées à 30°C pendant environ 1 semaine. La périphérie d'un essaim ainsi formé a été grattée et transférée sur une autre plaque du même milieu gélosé. Ce processus a été répété plusieurs fois pour obtenir un isolat frais dans une culture pure Après plusieurs transferts la pureté des souches est vérifiée sous le microscope.

### **III -6 Observation des caractères morphologique et culturaux :**

Les organismes analysés ont tous une forme bacillaire ou de tige sous microscope optique (Gx1000), et un aspect des essais sur gélose (mouvement par glissement) en plus de la formation de corps de fructification ce qui est caractéristique des myxobactéries (**Mohr, 2018**) .

#### **III -6-1 Corps de fructifications :**

Pour développer des fructifications, il faut solidifier d'environ 10 mm de profondeur de

milieu dans une boîte de Pétri. La morphologie des fructifications a été observée après 6 à 10 jours d'incubation à 30°C, et pour les couleurs de ces corps sont en général de couleurs orange, blanche, jaune, marron, transparente. La forme est sphérique bombée. Ils sont parfois mous, solides.



**Figure 22:** Observation directe de corps de fructification myxobactériens par loupe binoculaire Gx20

### **III -7 La mise en évidence de pouvoir antibactérien :**

Pour évaluer l'activité antagoniste des isolats myxobactériens, on utilise un milieu solide contre plusieurs germes (bactéries à Gram négatif, positif), levures et champignons.

#### **III -7-1 Confirmation la pureté des souches :**

Une culture microbienne pure est une population issue d'une seule cellule. C'est une condition préalable à toutes les expériences microbiennes. La culture de colonies issues d'une seule cellule n'est pas possible pour la plupart des espèces. La pureté de myxobactérie doit être assurée par la vérification des caractères morphologiques d'une colonie sur gélose ainsi que par observation microscopique (Boubric et Boussad, 2007).

#### **III -7-2 Préparation de l'inoculum :**

On prépare la suspension bactérienne toujours d'une culture jeune 18h puis on fait des dilutions et pour ajuster la turbidité de la suspension bactérienne on utilise les normes McFarland (densité optique égale à 0,2 à 650 nm).



### **III -7-3 La détermination des activités antibactérienne des myxobactéries :**

L'activité de l'isolat a été évaluée par la méthode du cylindre de gélose (Xie et al. 2005 ; Kumar et al., 2012). L'isolat a été ensemencé sur le milieu de purification d'eau congelée et *E. coli* morts en bandes serrées, puis incubé à 30°C. Après 10 jours d'incubation, un emporte-pièce a été utilisé pour découper aseptiquement un cylindre de 6 mm de diamètre dans la culture de l'isolat, puis le mettre dans une boîte de Petri Muller-Hinton ensemencée avec les cibles des bactéries ciblées. La boîte de Pétri doit être placée à 4°C pendant 2 heures pour assurer une bonne diffusion des substances biologiquement actives, puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Mesurer la zone d'inhibition de croissance après 24 heures d'incubation.

### **III -8 Extractions des métabolites secondaires :**

#### **III -8 -1 La fermentation :**

La fermentation a été réalisée dans un erlenmeyer de 500 mL contenant 250 mL de milieu de fermentation CY-H et incubée à 30°C pendant 14 jours sous agitation à 200 rpm. Après 14 jours de fermentation, la culture a été récoltée et traitée selon le procédé décrit par (Kunze et al. (1998).

#### **III -8 -2 Extraction en phase liquide :**

La culture bactérienne de 250 mL a été extraite par ajout de 250 mL d'un solvant organique exemple (acétate d'éthyle) . Le mélange a été agité pendant 60 min à température ambiante sur une ampoule à décanter en utilisant un agitateur réciproque (150 coups /min).

On a laissé se séparer pendant 45 min, et la phase organique a été filtrée à travers le papier filtre (Whatman n°1). Les filtrats ont ensuite été concentrés à sec à 40°C sous vide et stockés à 4°C pour une utilisation ultérieure (Foster et al, 1992).

#### **III -8 -3 La réalisation du test antimicrobien et antifongique :**

On utilise la méthode de diffusion en milieu solide (milieu Muller- Hinton) pour l'activité antibactérienne et (milieu Sabouraud) pour l'activité antifongique (Foster et al, 1992). De ce fait, chacun des disques de papier Wattman stérile N°3 et de diamètre 6 mm est imprégné par

20 µl de chaque extrait algal à une concentration de 50 mg /ml et placé à la surface du milieu de la boîte de pétri en présence des disques imbibés par une solution aqueuse (témoins négatifs). Des disques d'ampicilline commercialisée (à 10µg/ disque) comme témoins positifs, et des disques de cycloheximide (10µg/ disque) qui ont été pris comme antifongique pour les témoins positifs. Les boîtes ont été ensuite incubées 2h à 4°C puis à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30°C pendant 48 h pour les champignons. La mesure des diamètres des zones d'inhibition entourant les disques contenant les échantillons à tester a été réalisée (Mandelshtam, 2016).

### **III -8-3-1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :**

La CMI est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 h. Sa détermination a été faite par observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque tube.

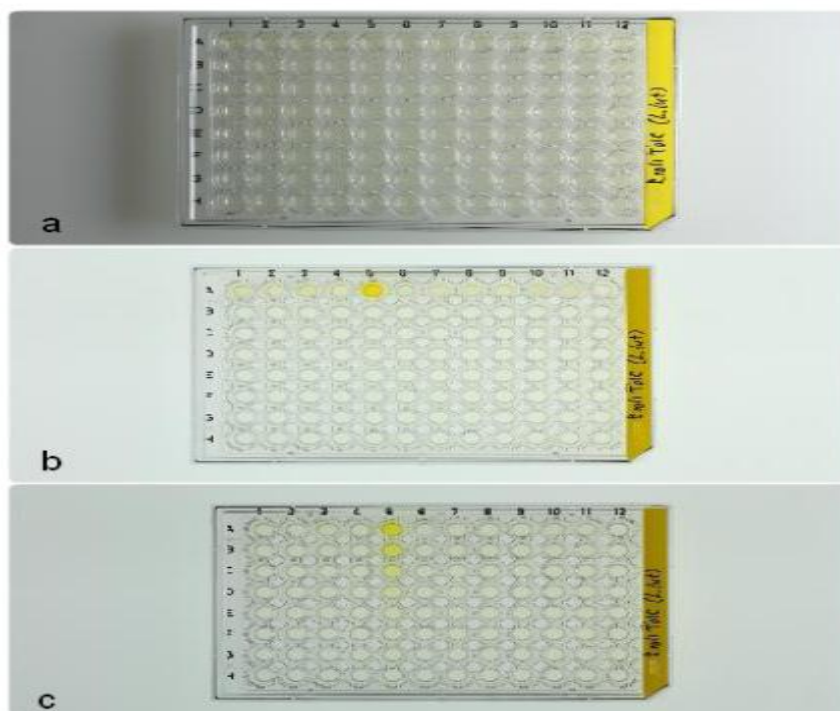
#### **III -8-3-1-1 Préparation de dilution :**

Pour les bactéries , la méthode de micro-dilution en bouillon a été utilisée pour déterminer la CMI. Tous les tests ont été effectués dans le milieu Mueller Hinton en bouillon. puis dilués à la concentration la plus élevée. Des dilutions en série ont été préparées dans une microplaque de microtitration de 96 puits dans la gamme de concentrations choisie. Les souches, dont la concentration finale a été ajusté à  $5 \times 10^5$  UFC/ml. Les bactéries ont été incubées, à 37 °C et à 30 °C pendant 24 h (Mandelshtam, 2016).

Pour les champignons , les CMI ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu gélosé . Les souches testées ont été cultivées dans un milieu Sabouraud , dans des boîtes de Pétri, pendant 5-7 jours. Les extraits testés, dissous dans du DMSO à 1%, ont été utilisé à différentes concentrations. Chaque concentration a été mélangée avec le milieu sabouraud semi-solide et stérile et ensuite versé dans des boîtes de Pétri stériles (15 ml dans chaque plaque). Les plaques ont été incubées pendant 5-7 jours à 28 °C.

### **III -8-3-1-2 Préparation d'inoculum :**

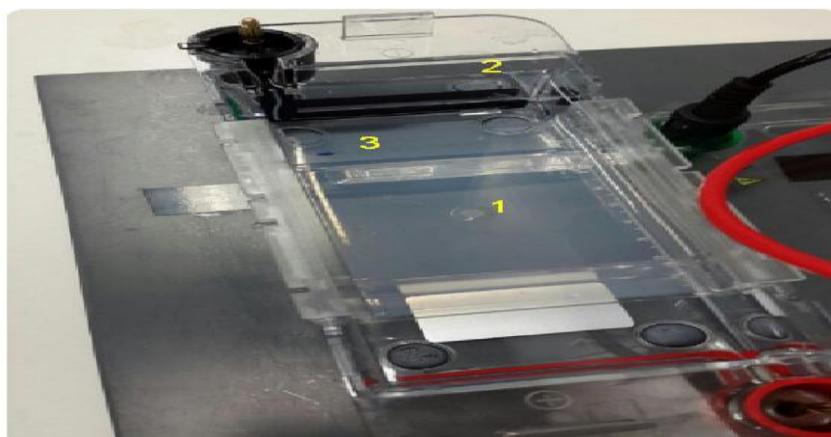
Des microplaques de bio-analyse (par Techno Plastic Products AG) avec 8 rangées et 12 Colonnes , au total 96 puits, sont utilisées pour effectuer des séries de dilutions. Sur chaque Plaque une souche a été testée avec onze extraits, qui avaient des concentrations décroissantes haut au bas d'une colonne. Après la préparation, la culture microbienne a été distribuée sur une plaque à l'aide d'une pipette multicanal. Dans la première rangée, 280 µl de la culture de l'organisme testé sont ajoutés, tandis que les autres rangées ont été remplies de 150 µl. Après cela, les puits 1 à 11 de la première rangée (rangée A) ont été en outre remplis de 20 µl d'extraits bruts différents. Le 12ème puits de la première rangée est rempli de 20 µl de méthanol pour servir de contrôle positif, puisque des extraits à base de méthanol ont été testés. Après que la première rangée est chargée avec les extraits, une série de dilutions de la rangée A à la rangée H a été effectuée avec une pipette multicanal. Tout d'abord, le contenu de la rangée A est mélangé par le pipeting de haut en bas. Puis 150 µl de la rangée A a été prise et transférée à la rangée B, où elle a été mélangée avec les 150 µl initiaux de la culture microbienne. La solution qui en a résulté a ensuite été transférée dans la rangée suivante et la procédure s'est poursuivie jusqu'à la ligne H. Enfin, les puits de la rangée H ont été mélangés et les 150 µl supplémentaires ont été aspirés avec la pipette et éliminés, laissant la plaque entière avec 150 µl dans chaque puits (Mandelstam, 2016).



**Figure 23** : Plaque d'essai biologique, remplie de a) culture microbienne d'un organisme d'essai, b) en plus des extraits testés dans la première rangée, c) avec des extraits, dilués de haut en bas

### III -9 L'identification :

L'identification des souches nouvellement isolées a été effectuée par séquençage d'une partie du gène de l'ARNr 16S. Tout d'abord, l'ADN génomique a été isolé et la PCR avec des amorces, correspondant à la quasi-totalité du gène de l'ARNr 16S, a été réalisée. La qualité et la quantité des produits PCR ont été vérifiées par électrophorèse sur gel. Les produits PCR ont été purifiés avec un kit commercial et la première partie du gène de l'ARNr 16S (jusqu'à 800 pb) a été séquencée à l'aide de trois amorces différentes. Les séquences ont été comparées à celles disponibles dans la base de données publique NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Mandelshtam, 2016) .



**Figure 24 :** Photo d'un gel partiellement chargé à l'intérieur d'un appareil d'électrophorèse. 1. - Gel d'agarose; 2. – Châssis de l'appareil d'électrophorèse ; 3. – Puits de chargement dans le gel, formés par le peigne.

# **Résultats et Discussion**

## **IV-1 Echantillonnage :**

### **IV-1-1 en Algérie :**

**Cherifi et Ameur (2020)** ont fait des prélèvements de 9 échantillons à partir de différentes zones.

Le sol de la zone humide est représenté par un site d'échantillonnage au niveau de la wilaya d'Aïn Temouchent, alors que des prélèvements réalisés dans la wilaya de Saïda (Ainzerga, Moulay Larbi et Daoud) pour représenter la zone climatique semi-aride. Le sol de la zone aride est représenté par un échantillon obtenu dans la wilaya de Bechar et le sol saharien est prélevé dans la wilaya d'Ouargla. L'écosystème salin est représenté par un prélèvement à partir du sol de sebkha de Bougtob. Tandis que les sédiments marins sont obtenus dans deux sites situés dans la wilaya de Mostaganem (Sablete et Salamandre).

Pour notre étude on a choisit seulement 2 échantillons représentés par la wilaya Aïn Temouchent ( zone humide ) et la wilaya de Mostaganem ( sédiments de mère )

### **IV-1-2 en Népal :**

Dans différentes régions géographiques du Népal, échantillons de sol ont été prélevés dans la partie supérieure ( de sol riche en matière végétative (écorce d'arbres , bois pourris ) ) creusant à quelques centimètres du profil du sol. Les échantillons ont été collectés sur un sac zippé en plastique stérile et transportés au laboratoire sous forme séchée (**Rana et al , 2019**). Les myxobactéries ont été criblées à partir des échantillons de sol prélevés dans différentes parties du Népal.

### **IV-1-3 en Japon :**

Le prélèvement de 60 échantillons a été à partir le sol de forêts, à Yokohama et Kawasaki (Kanagawa, Japon) étaient les principales sources d'isolement. (**Shigeru et al ,1987**)

## **IV-2 Méthode d'isolement:**

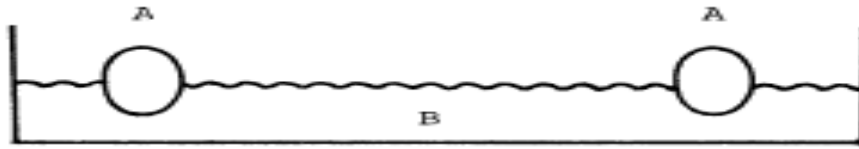
Etant donné que les souches myxobactériennes sont considérées comme très bonne source de molécules bioactives à intérêt médical dont l'activité antimicrobienne en particulier est

souvent problématique à cause de difficultés qui accompagnant le processus d'isolement et de purification (**Reichenbach ,1993**).

Le sol utilisé pour l'isolement des myxobactéries doit être séché à l'air dans une température ambiante généralement basse température environ 2 semaines pour éviter la croissance des autres bactéries à l'obscurité avant de l'isoler.

- ❖ **Cherifi etAmeur (2020)** ont fait l'isolement des myxobactériés par des différents techniques tel que la technique par appâtage avec des granulés de fumier et par appâtage à l'aide des stries *Escherichia coli* .
  
- ❖ **Rana et al.(2019)**ont utilisé la technique d'appâtage à partir des échantillons de sol collectés. Des *E. coli* vivants et de la levure de boulanger autoclavée ont été striés, striés en croix ou en pointillés sur de la gélose à l'eau incorporée au cycloheximide (25 g/mL) sous forme de trois stries, stries croisées ou points. Des échantillons de sol traités au cycloheximide (25 g/mL) ont été placés sur *E. coli*/levure autoclavée et incubés à 30 °C pendant 3 à 20 jours.
  
- ❖ **Shigeru et al.(1987)** ont fait isolement par les quatre méthodes suivantes.
  - a-** Méthode de la bouse de lapin : Les myxobactéries dans les sols ont été isolées comme suit. Le sol a été placé dans une boîte de Pétri (environ 80-100 mm de diamètre) à une profondeur de 10-15 mm, et humidifié par pulvérisation d'eau stérile. Les crottes de lapin ont été stérilisées à la vapeur (100°C, 10 min), immergées dans une solution d'actidione (2,5 mg/100 ml) pour stériliser instantanément les moisissures, puis déposées sur le sol (6- 8 pièces/plaque) .





**Figure 25 :** Illustration schématique de la méthode d'isolement des myxobactéries par appâtage avec des granulés de fumier (Méthode du bouse du lapin). A : bouse de lapin (6-8 pièces/assiette). Les myxobactéries produisent des fructifications sur leur surface. B : Le sol.

**b.** Placer des sols sur des frottis bactériens. De petites quantités de sols ou de matières végétales ont été placées sur des cellules bactériennes humides striées sur de la gélose ordinaire (2%) .

**c-**Méthode papier filtre : Un morceau de papier filtre a été placé sur STANIER'asgarmium

**d-** Milieu gélosé : Des sols ou du matériel végétal ont été épandus sur un milieu gélosé SP modifié ; la formation de fructifications a été étudiée.

- D'après les résultats d'isolement de 3 pays on observe que le nombre d'isolat du japon ( 132 ) par rapport des échantillons (60) est le plus grand que les deux autres , Algérie 09 échantillon avec 13 isolats.

### IV-3 Purification :

- ✓ **Cherifi etAmeur(2020)** ont fait leur purification a l'aide d'une aiguille stérile les colonies et les fructifications sont transférés sur des boitesde pétri contenant la gélose CY par dépôt.

Le processus de transfert est mené plusieurs fois jusqu'à ce que les cultures pures des myxobactéries sont obtenues après plusieurs transferts la pureté des souches est vérifiée sous le microscope.

La reconnaissance des myxobactéries a été réalisée au stéréomicroscope par la morphologie

des colonies et des fructifications selon les critères décrits par (**Reichenbach et Dworkin 1992**).

- ✓ **Rana et al. (2019)** ont fait la purification par aiguille stérile, ils ont été transférés dans des plaques de gélose CY
- ✓ **Shigeru et al. (1987)** ont fait la purification à l'aide d'une petite partie des fructifications qui a été grattée avec une aiguille en platine et transférée sur un milieu gélosé SP modifié. Lorsqu'une fructification était de type rigide, elle était transférée dans une solution saline avec des billes de verre (environ 1 mm de diamètre) dans un tube à essai, et macérée avec un mélangeur.

La suspension ainsi obtenue a été étalée sur le milieu gélosé SP modifié. Les plaques ensemencées ont été incubées à 30°C pendant environ 1 semaine. La périphérie d'un essaim ainsi formé a été grattée et transférée sur une autre plaque du même milieu gélosé. Ce processus a été répété plusieurs fois pour obtenir un isolat frais dans une culture pure. Lorsqu'une culture pure a été obtenue

- Dans cette étape Algérie et Népal ont utilisés le même milieu (gélose CY) et Japon a utilisé le gélose SP modifié .

#### **IV-4 Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique :**

- **Cherifi et Ameur (2020)** ont étudiés le pouvoir antagoniste de l'isolat myxobactérien vis-à-vis des deux bactéries indicatrices à savoir ; deux bactéries pathogènes :  
bactérie à Gram positif : *Staphylococcus aureus* , une bactérie à Gram négatif : *Escherichia coli*

Par deux méthodes directes (méthode de Fleming et méthode de cylindre d'agar).

##### **IV-4 -1-1 Technique de Fleming :**

Par rapport aux deux tests de souche bactérienne, les résultats de l'activité antibactérienne obtenus par cette méthode sont rapportés dans (Tableau 01 ) et. L'inhibition entraîne la

formation de zones claires avec des limites claires autour de la séparation déposée

**Tableau01** : Résultat de l'activité antibactérienne des deux isolats contre les deux souches indicatrices déterminées par la méthode de Fleming.

| Isolats<br>myxobactériennes | Diamètre des zones d'inhibition (mm) |                 |
|-----------------------------|--------------------------------------|-----------------|
|                             | <i>E.coli</i>                        | <i>S.aureus</i> |
| Myx 01(Ain temouchet)       | 0                                    | 0               |
| Myx 02 (mostaganem)         | 33                                   | 0               |

- l'isolat Myx 01(Ain temouchet) ne présente aucune activité antibactérienne contre les deux bactéries (*E.coli*, *S.aureus*). Alors que l'isolat Myx 02 (mostaganem) agit seulement sur bactérie gram négatif (*E coli*) avec un diamètre d'inhibition de 33 mm .

#### IV-4 -1-2 Technique de cylindres d'agar :

**Tableau 02** : Résultat de l'activité antibactérienne des isolats contre les deux souches indicatrices déterminées par la méthode de cylindres d'agar

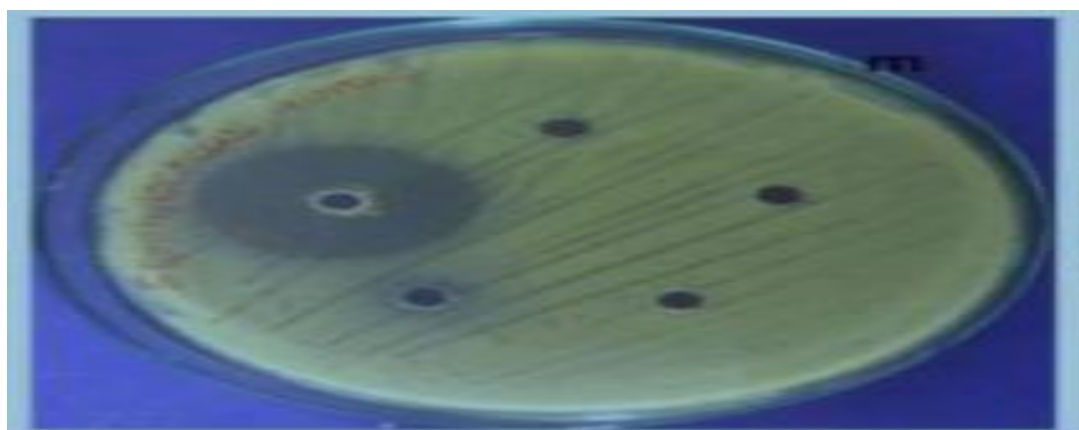
| Isolats<br>Myxobactériennes | Diamètre des zones d'inhibition (mm) |                 |
|-----------------------------|--------------------------------------|-----------------|
|                             | <i>E.coli</i>                        | <i>S.aureus</i> |
| Myx 01(Ain temouchet)       | 0                                    | 0               |
| Myx 02 (Mostaganem)         | 0                                    | 17              |

- **IV-4 -2-1 Le test antimicrobien :**

Pour évaluer le test antimicrobien, (Rana et al. 2019) ont utilisés des bactéries pathogènes *S. aureus* *E. coli* a été prélevée in vitro.

le test antimicrobien a été réalisé par la méthode de diffusion en puits d'agar par l'utilisation l'extrait d'acétate d'éthyle des isolats. L'extrait des échantillons NR-1 et NR-2 était actif contre la deux souches bactériennes prises à l'étude. NR-1 a montré la plus haute ZOI (zone d'inhibition) 9,33 mm contre *S. aureus* et une zone d'inhibition de 4.66 mm de diamètre contre *E. coli*, et NR-2 a montré 7 mm contre *S. aureus* et 5.66 mm contre *E. coli*

La zone d'inhibition est montrée dans les **figures 28**



**Figure 26:** Criblage de l'activité antimicrobienne sur *S. aureus*

**Tableau 03 :** Propriété lytique des isolats contre deux bactéries

| Echantillons | Microorganismes |                  |
|--------------|-----------------|------------------|
|              | <i>E. coli</i>  | <i>S. aureus</i> |
| NR-1         | +               | +                |
| NR-2         | +               | +                |

Remarque : (+) = Capable de lyser le culot de cellules microbiennes. (-) = incapable de lyser le culot de cellules microbiennes

● **IV-4 Le test antifongique :**

La méthode de diffusion dans des puits de gélose a été réalisée sur *Aspergillus niger*,

après 3 à 7 jours d'incubation, NR-1 a montré une zone d'inhibition de diamètre 7.33mm par contre NR-2 n'a montré aucune zone d'inhibition (Rana et al ,2019)

- **Le test antimicrobien**

(Shigeru et al. 1987 ) ont utilisés *Staphylococcus aureus* , *E.coli* Après d'incubation, une zone d'inhibition a été observée de diamètre 5 ,2 et 13 Mm respectivement .

- **Le Test antifongique :**

Et pour le test antifongique, Myx 04 a montré une zone d'inhibition de 3 mm de diamètre contre *Aspergillus niger* .

**Tableau 04 :**Résultats de l'activité antimicrobienne et l'antifongique obtenus par la méthode de cylindres d'agar

| Isolats myxobactériennes | Microorganismes              |               |                          |
|--------------------------|------------------------------|---------------|--------------------------|
|                          | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>E.coli</i> | <i>Aspergillus Niger</i> |
| Algérie (Myx02)          | 17                           | 0             |                          |
| Népal (NR-1)             | 9.33                         | 4.66          | 5                        |
| Japon (Myx04)            | 5.2                          | 13            | 3                        |

D'après les résultats obtenus on remarque que les myxobactéries collectés de sédiment marin de Mostaganem (Algérie) a une forte activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de diamètre 17 mm par rapport aux deux autres . Par contre que le sol forêstier collecté du Japon (Myx 04) a une forte activité antimicrobienne

contre *E.coli* avec un diamètre 13 mm par rapport aux deux autres où l'isolat myxobactérienne d'Algérie (Myx 02) n'a aucune activité antimicrobienne contre cette souche .

- Le sol Népalais (NR-1) a une activité antifongique plus grande que le sol Japonais (Myx 04) .

#### **IV-5 Extraction des métabolites secondaire :**

- (Cherifi et Ameur (2020) ont fait l'extraction des métabolites les antibiotiques à partir d'un milieu liquide .

Les myxobactéries sont inoculés dans CYB de 100 ml dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml et incubées à 30°C dans un incubateur rotatif à 200-250 tr/min pendant 72 h. Ceux-ci sont utilisés (6 ml) pour inoculer des volumes de 400 ml de milieu CYB dans 11 flacons Erlenmeyer qui ont été incubés pendant 4-6 jours à 200 tr/min à 30°C.

Les cellules ont été enlevées par centrifugation à 10 000 tr/min pendant 15 min et le surnageant a été extrait en secouant avec 1 vol de chloroforme. La phase chloroforme est séparée et concentrée sous pression réduite à 30°C. L'extrait brut a été dissous dans un petit volume de chloroforme (1 ml d'extrait dans 2L de milieu de culture) .

- Rana et al.(2019) ont fait l'extraction des métabolites secondaires a partir la culture bactérienne de 250 mL qui a été extraite par ajout de 250 mL d'acétate d'éthyle.

Le mélange a été agité pendant 60 min à température ambiante sur une ampoule à décanter en utilisant un agitateur réciproque (150 coups par min). On a laissé se séparer pendant 45 min, et la phase organique a été filtrée à travers le papier filtre (Whatman n°1). Les filtrats ont ensuite été concentrés à sec à 40°C sous vide et stockés à 4°C pour une utilisation ultérieure.

- Shigeru et al , (1987) ont fait les extractions des métabolites par deux méthodes :

##### **IV-5-1 Extraction en phase solide.**

Cinquante millilitres du bouillon récolté ont été centrifugés à 2000 g pendant 15 min et 12

ml de surnageant ont été chargés sur une colonne d'extraction en phase solide (SPE) de 3 ml (63 × 9 mm) remplie de 1,2 ml de résine HP-20, préalablement lavée avec 6 ml de méthanol puis conditionnée par 6 ml d'eau distillée. Les colonnes ont été lavées avec 5,8 ml d'eau et éluées par 5,8 ml d'un mélange méthanol : eau 3 : 1 (v/v) et les éluats ont été distribués dans une plaque 96 puits (200  $\mu$ l par puits). Les échantillons ont été concentrés à sec sous vide. Les plaques ont été couvertes et stockées à -10°C.

#### IV-5-2 Extractions en phase liquide.

Les résidus de culture de 25 ml ont été extraits par 25 ml d'acétate d'éthyle. Les mélanges ont été agités pendant 60 min à température ambiante sur un agitateur réciproque (150 coups par min) puis centrifugés à 2000 g pendant 10 min. Les tubes ont été stockés à -80°C pendant 30 min et les phases organiques ont été filtrées sur papier filtre (Rapida A 90 g m<sup>-2</sup>; Superfiltrorsrl, Milan, Italie). Les solutions filtrées ont été distribuées dans des plaques de microtitration (200  $\mu$ l par puits) puis concentrées à sec à 40°C sous vide et conservées à 10°C.

#### IV-6 Discussion générale :

Les myxobactéries ont récemment suscité l'intérêt des chercheurs en raison de leur capacité à produire un large éventail de métabolites secondaires (enzymes, antibiotiques et anti fongiques) utiles c'est ce qui nous a poussé à faire ce travail, pour un but d'établir d'une méthodologies d'études des myxobactéries sur la base des travaux déjà réalisés.

D'après les résultats d'isolement de 3 pays, on observe que le nombre d'isolat du Japon (132) par rapport des échantillons (60) est le plus grand que les deux autres, Algérie 09 échantillons avec 13 isolats. Cette différence du nombre d'isolat peut être due à la source d'isolement des myxobactéries elle-même.

L'isolement se fait par plusieurs méthodes : par appâtage avec granulée de fumier, à l'aide des séquences *E. coli*, à l'aide des séquences *E. coli* vivante, à l'aide de papier filtre et ce qui concerne la purification, elle s'effectue à partir des essaïms, des fructifications qui sont transférées sur des boîtes pétri contenant la gélose CY pour Népal et Algérie et gélose SP modifié pour Japon.

Pour les résultats des activités antimicrobiennes on a trouvé que les myxobactéries obtenues de sédiments marins Algériens sont actives contre la bactérie *Staphylococcus aureus* au contraire , les myxobactéries collectées de sol de forêstier ont une forte activité contre la bactérie *E. coli* .

La forte activité antifongique a été observée dans le sol riche en matière végétale ( écorces d'arbres ) Népalais.

Pour l'extraction des métabolites secondaires l'Algérie et le Népal fait ces extractions en phase liquide avec des différents milieux : le chloroforme et acétate d'éthyle respectivement au contraire au Japon , elle a fait des extractions au milieu liquide et solide par utilisation de acétate d'éthyle pour la séparation



# Conclusion

## Conclusion :

Les myxobactéries sont des bactéries Gram-négatives exceptionnelles en forme de bâtonnet et Appartiennent au delta protéobactéries, ordre Myxococcales . Ils ont un style de vie unique qui les distingue des autres organismes procaryotes .en cas de la famine , les Cellules végétatives sont capable de s'agréger en colonies de cellules, appelées fructifications, Une autre caractéristique intéressante distinctive des myxobactéries c'est son mode de Motilité. Il est par glissement

Les myxobactéries sont caractérisées par leur énorme potentiel de production de divers métabolites secondaires tels que les antibiotiques, les antifongiques , et les enzymes. dont beaucoup ont une bioactivité. Parmi les myxobactéries décrits les métabolites secondaires environ 30 % ont une activité antibiotique.

Dans l'ensemble notre travail a été fait pour un objectif d'établir d'une méthodologie d'étude des myxobactéries sur la base des travaux déjà réalisés dans ce domaine.

L'isolement se fait par plusieurs méthodes : isolement du sol par appâtage avec granulée de fumier, à l'aide des striés *E. coli*, à l'aide des séquences *E. coli* vivante, à l'aide de papier filtre. Ce dernier est fait de plusieurs biotopes naturels à savoirs le sol (sol des forêts, sol au bord des rivières et le sol thermal, sol des zones arides) , sédiments marins

La purification s'effectuée à partir des essaims, des fructifications qui sont transférées sur des boites pétri contenant la gélose CY par dépôt.

L'évaluation du pouvoir antagoniste de l'isolats myxobactérienne retenus est étudié vis-à-vis des deux bactéries indicatrices ; Une bactérie a Gram positif : *Staphylococcus aureus* , et une autre à Gram négatif : *Escherichia coli* et le pouvoir antifongique est testé par le champignon *Aspergillus niger* par deux méthodes directes (méthode de Fleming et méthode de cylindre d'agar).

D'après les résultats obtenus par la méthode de cylindre d'agar ; les myxobactéries collectés du sol de zone humide Ain temouchent (Myx 01 ) n'a montré aucune activité antibactérienne contre les deux souches et l'isolat de sédiment marin (Myx02) de l'Algérie a

une forte activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de diamètre 17 mm .par contre que le sol forêstier collecté du Japon a une forte activité antimicrobienne

contre *E.coli* avec un diamètre 13 mm contrairement au l'isolat (Myx02) n'a aucune activité antimicrobienne contre cette espèce .

les myxobactéries collectées du sol riche en matière végétale sont actives contre le champignon *Aspergillus niger*

# **Référence**

# **Bibliographique**

Référence bibliographique :

- **Alam MF, Cohen D, Butler C, Dunstan F, Roberts Z, Hillier S, et al. (2009)** The additional costs of antibiotics and re-consultations for antibiotic-resistant *Escherichia coli* urinary tract infections managed in general practice. *Int J Antimicrob Agents*. Mar;33(3):2557
- **Jana et al. (2006)** Molecular understanding of aminoglycoside action of resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 70 :140-150.
- **Auckenthaler R.** Activité antibactérienne. Spectre. Mode d'action. Cibles bactériennes. In : *Antibiothérapie en pratique clinique*. BERGOGNE-BEREZIN E., DELLAMONICA P. Masson, 1995 :P17-32
- **Benabad. Z. (2017).** «Rôle de la Sous-Unité Sigma de l'ARN Polymérase Bactérienne dans la Tolérance aux Antibiotiques». These Degree Biologie Santé, Montpellier: Université Montpellier, p.169.
- **Buntin. K., Irshik. H., Weissman. K.J., Luxenburger. E., Blocker. H., Muller. R. (2010).** « Biosynthesis of Thuggacins in Myxobacteria: Comparative Cluster Analysis Reveals Basis for Natural Product Structural Diversity ». *Chemistry & Biology*, VOL.17, p.342–356.
- **Camille D. (2007).** «Microbiologie Pratique Pour le Laboratoire D'analyses ou de Contrôle Sanitaire». p, 248, 250, 296, 320, 341, 359, 476.
- **Cavallo, J.-D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., Garrabe, E. (2004).** «Bêtalactamines : Beta-lactam Antibiotics». *EMC-Maladies infectieuses*, 1, p.129-202.
- **Carlet J, Shlemmer B (2015).** Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France: nécessité d'une mobilisation déterminée et durable. [cited 2015 Dec 8]; Available from: <http://www.cclinnd>
- molecular biology
- **Davies J (2010)** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 417-433.
- **Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA & Collins JJ (2007)** A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130: 797-810
- **Dawid, W. (2000).** «Biology and Global Distribution of Myxobacteria in Soils». *FEMS epidemiologie of bacterial resistance microbial resistance microbial*. Mol . biol rev 65 232 260
- **Chopra, I., Roberts, M. (2001).** Tetracycline antibiotics mode of action, applications. *Microbiology Reviews*, Vol. 24, No. 2000, p. 403-427.
- **Denis. F., Ploy. C.M., Martin. Ch., Bingen. É., Quentin. R. (2007).** « Bactériologie médicale : Techniques usuelles». *Elsevier Masson SAS* -62 rue Camille –Desmoulins, 92442 Issy-les- Moulineaux cedex, 573P (ISBN: 978-2-21-1-01171-6).

- ● **Dworkin, M. (1966).** «Biology of the Myxobacteria». *The Annual Review of Microbiology*, Vol. 20, p. 75-102.
  - **Fabrega A, Madurga S, Giralt E & Vila J (2009)** Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* 2: 40-61
- **8- Ferraro, MJ , Wikler, MA , Craig, WA , Dudley, MN , Eliopoulos, GM , Hecht, DW , Hindler, J. , Reller, LB , et al. ( 2003 )** Méthodes de dilution des tests de sensibilité aux antimicrobiens pour les bactéries à croissance aérobie . Norme approuvée, vol. 23 non. 2, 6e éd. Document NCCLS M7-A6. Wayne, Pennsylvanie : NCCLS
- **Fernandes R, Amador P & Prudêncio C (2013)**  $\beta$ -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev Med Microbiol* 24: 7-17
- **Foster, H.A., Yasouri, F.N., Daoud, N.N. (1992).** «Antibiotic Activity of Soil Myxobacteria and Its Ecological Implications». *Federation of European Microbiological Societies*, Vol. 101, pp. 27-32
- **Garcia, R., Gerth, K., Stadler, M., Ireneo, J., Dogma, J.r., Müller, R. (2010).** «Expanded Phylogeny of Myxobacteria and Evidence For Cultivation of The Unculturable ». *Molecular Phelogenetics and Evolution*, pp. 879-887.
- **Gaynor M & Mankin AS (2003)** Macrolide antibiotics- binding site, mechanism of action, resistance. *Curr Top Med Chem* 3: 949-961
- **Irshik. H., Gerth. K., Hofle. G., Kohl. W., Reichnbach. H. (1983).**
- « The myxopyronins, New Inhibitors of Bacterial Rna Synthesis from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales)». *The journal of antibiotics*, Vol. xxxvi, no. 12, p. 1651-1658.
- **Irshik. H., Jansen. R., Hofle. G., Gerth. K., Reichnbach. H. (1985).** «The coralopyronins, New Inhibitors of bacterial Rna Synthesis from Myxobacteria».
- *The journal of antibiotics*, Vol. xxxviii, no. 12, p. 145-152.
- **Kaur. Rajanbir., Kumari. Arpna., Kaur. Ramandeep., Kaur. Rajinder. (2018).** «Myxobacteria : Producers of Enormous Bioactive Secondary Metabolites *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. Vol. 9, p. 309-313.
- **Kaiser, D. (2004).** Signaling in myxobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 58, 75-98
- **Kohanski MA, Dwyer DJ & Collins JJ (2010)** How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 8: 423-435
- **Kunze, B., Kohl, W., Holfe, G., Reichnbach, H. (1985).** «Production, Isolation, Physico-Chemical and Biological Properties of Angiolam a, A New Antibiotic from *Angiococcus Disciformis* (Myxobacterales) ». *The journal of antibiotics*, Vol. xxxviii, NO. 12, p. 1649-1654.
- **Laurent. F. (2009).** «Principales  $\beta$ -lactamines : Pénicillines G, A, M, inhibiteurs de  $\beta$  - lactamases, Uréidopénicillines, Carboxypénicillines C1G, C2G, C3G, Monobactames Carbapénèmes». *Laboratoire de Microbiologie Groupement Hospitalier, Nord Lyon*. P 8.
- **Lesueur, P. (2014).** «Antibiotiques : Modes d'action, Mécanismes de la Résistance». *Développement et santé*. Paris <https://devsante.org/articles/antibiotiques-modes-d-action-mecanismes-de-la-resistance>

- **Mandelstam, M. (2016).** « Induction of Secondary Metabolites Production in Myxobacteria Under Conditions of Heavy Metal Stress». *The academic degree Bachelor of Engineering*“(B.Eng.). Germany: Ostfalia University of Applied Sciences, p.89.
- **Mazaikina, V. (2016).** « Marine myxobacteria as a Source of Antibiotics». The academic Degree Bachelor of Engineering“( B.Eng.).Germany: Ostfalia University of Applied
- **Meliah. S., Lisdiyanti. P. (2018).** «Isolation, Characterization and Molecular Identification of Myxobacteria from Two Outermost Islands of Indonesia». *Biotropia [en ligne]*. Vol.25, N.2, 121-129 PP. DOI : 10.11598/btb.2018.25.2.796 Disponible sur[https://www.researchgate.net/publication/328917575\\_Isolation\\_characterization\\_and\\_molecular\\_identification\\_of\\_myxobacteria\\_from\\_two\\_Outermost\\_Islands\\_of\\_Indonesia](https://www.researchgate.net/publication/328917575_Isolation_characterization_and_molecular_identification_of_myxobacteria_from_two_Outermost_Islands_of_Indonesia) (Consulté le 23/06/2020)
- **Mohr, K.I. (2018).** «Diversity of Myxobacteria—We Only See the Tip of the Iceberg». *Microorganisms*. Vol. 6, No. 84, p. 1-23.
- **Mohr.K.I., Zindler.T., Wink.J., Wilharm.E., Stadler. Marc. (2017).** «Myxobacteria in High Moor and Fen: An astonishing Diversity in a Neglected Extreme Habitat». *MicrobiologyOpen*. Vol.6, pp.9.
- **Rana, N., Khadka, S., Prasad,B Marasini, B.P., Joshi, B., Poudel, P., Khanal, S., Parajuli, N. (2019).** « Isolation and Characterization of Soil Myxobacteria from Nepal». *Journal of Institute of Science and Technology*, Vol. 24(2), ISSN: 2469-9062, pp. 7-16.
- **Reichenbach, H. (1983).** «A simple method for the purification of myxobacteria». *Journal of Microbiological Methods*, vol.1, p.77-79.
- **Reichenbach .H, Hoflet. G. (1993).** «Biologically Active Secondary Metabolites From Myxobacteria». *Biotech. Adv.* Vol.11.p. 219-277.
- **Reichenbach H , Dworkin M. (1992).** « The prokaryotes: The Myxobacteria » . 2ème édition, New York , p. 3418-3487. ●
- **Reichenbach, H. (1999).** «The ecology of the Myxobacteria». *Environ Microbiol.* vo.1, p.15–21.
- **Reichenbach, H., Gerth, K., Irschik, H., Kunze, B., Hofle, G. (1988).** «Myxobacteria: a Source of New Antibiotics». *TIBTECH*, vol.6, p.115-121.
- .
- **Perry, J-J., Staley, J-T., Lory, S. (2004).** «Microbiologie». Paris: Dunod, p497–498.
- **Schaberle. T.F., Lohr. F., Schmitz. A., Konig. G.M. (2014).** «Antibiotics from Myxobacteria». *Royal Society of Chemistry*.
- **SHIGERU YAMANAKA, AKIH[IKO KAWAGUCHI,\* AND KAZUO KOMAGATA( 1987),**isolation and identification of myxobacteria froù soils and plants materials with special references to DNA composition , quinine system and cellular fatty acid composition and with a description of new specis myxococcus flavenscens , Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.,Kawasaki 210, Japan\* Department of Biology, The University of Tokyo,Meguro-ku, Tokyo 153,

Japan\*\* Institute of Applied Microbiology , The University of Tokyo,Bunkyo-ku,  
Tokyo 113, Japan(Received March 2, 1987)

- **Shimkets, L .J. (1990).** «Social and Developmental Biology of the Myxobacteria». *American Society for Microbiology*. Vol. 54, No. 4, p. 473-501.
- **Skiada A, Markogiannakis A, Plachouras D & Daikos GL (2011)** Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 37: 187-193
- **Smith R, Coast J.** The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ*. ( 2013 )Mar 11;346(mar11 3):f1493–f1493
- **Weissman, KJ., Müller, R. (2010).** «Myxobacterial Secondary Metabolites: Bioactivities and Modes-of-Action». *Natural Product Reports*, vol. 27, p.1276-1295.
- **Williams., Wilkins. (1993).** « Microbiologie\_et\_Pathologie\_Infectieuse ». 2ème édition. PARIS, 962P (ISBN: 2-8041-1592-5).
- **Zeba .B .2005** .overview of beta lactamase incidence on bacterial drug resistance africain journal of biotechnology . 4 (13) – 1553.1562
- **Zhang, X.; Yao, Q.; Cai, Z.; Xie, X.; Zhu, H. (2013).** «Isolation and Identification of Myxobacteria from Saline-Alkaline Soils in Xinjiang, China». *PLoS One*, Vol.8, e70466. P.11.