



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

Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Biologie

Option : microbiologie appliquée

Présenté par :

Melle AMEUR SARA et Melle CHERIFI AMINA

Intitulé du Thème

**Isolement des myxobactéries éventuellement
productrices d'antibiotiques à partir de différents
écosystèmes naturels d'Algérie**

Soutenu le 13/09/2020

Devant le jury composé de :

Mr. Sitayeb T.	Professeur (Université de Saïda)	Président
Mr. Adli D.H	Maître de conférences A (Université de Saïda)	Examineur
Mr. Benreguiég M.	Maître de conférences A (Université de Saïda)	Promoteur

Année universitaire 2019/2020

REMERCIEMENTS

Nous devons en premier Lieu exprimer l'énorme remerciement à notre Dieu miséricordieux qui a permis d'acquérir un tel niveau de savoir.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à notre promoteur **Mr Benregueig Mokhtar**, pour la confiance et la haute valeur pour nous avoir proposé ce sujet, pour son encadrement, ses encouragements, ses orientations, pour ses aides, sa patience, ses conseils scientifiques judicieux, sa compétence et sa gentillesse qui nous ont permis de bien mener ce modeste travail.

Nous remercions par ailleurs vivement les membres du jury : **Mr Sitayeb Tayeb** et **Mr Adli Djallal Eddine**, de nous avoir fait l'honneur de juger notre travail et d'assister à la soutenance.

Nos remerciements s'adressent également aux Professeurs Associés : **yasser Fathy Abdelaliem Eied**, du Département de Microbiologie Agricole, Faculté d'Agriculture, Université Fayoum, Égypte, Il a toujours été à nos côtés. Il nous aide à initier au travaille par ses informations et ces expériences sur ce thème. Nous voudrions, de façon particulière le saluer.

Nous remercions aussi **Mr Hamad Ahmed** le responsable du laboratoire pédagogique de microbiologie appliqué pour son gentillesse, son aide, et son disponibilité

Enfin Nous tenons aussi à adresser nos vifs remerciements à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation En particulier **Mr Gacemie Bou Abdellah**



DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à :

Ceux que j'aime le plus au monde **Mes très chère parents** qui m'ont beaucoup soutenu et encouragé jusqu'au bout et que dieu leur accorde une longue vie.

Je le dédie aussi ma très chère sœur unique **Chahd**
A mes frères : **Zakaria Abdelkader Taha**

A toute ma famille, petite et grande, sans exception.

A l'ensemble des enseignants qui m'ont suivi durant mes années d'études, de primaire jusqu'à l'université

A toutes mes très chères amies surtout **Ahlem Hadjira Bouchra**
En particulier à mon binôme **Amina** que souhaite de bonheur succès à sa vie.

En fin je dédie tous ceux connu moi de près ou de loin.

SARA



DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à :
Mes très chers partants pour leurs encouragements qui n'ont
jamais cessés de me consentir durant les années d'études.

Je demande à Dieu de les protéger et leur réserver
Une longue vie.

A mes Très chers frères :

Maamar et Mostapha.

A mes Très chères sœurs : **Zineb, Fadéla, Setti, Fatna,**
Surtout la grande **Fatiha** et leurs enfants.

A mon binôme **Sara**, A toutes mes très chères amies
Surtout, **Aicha, Khaoula, Meriem.**

A l'ensemble des professeurs qui m'ont suivi durant mes années
D'études, de primaire jusqu'à l'université témoignage de ma
reconnaissance aux efforts qu'ils ont consentis en ma faveur
surtout mon maître d'école primaire

Allo Khalifa.

A toute personne qui me connaît de près ou de loin.

AMINA

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, ou des échecs thérapeutiques. Ces raisons font l'objectif de chercher des nouvelles molécules à activité antibactérienne. Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la recherche des myxobactéries productrices de molécules bioactifs à partir de différents écosystèmes naturels. Neuf sites d'échantillonnage sont choisis pour réaliser l'isolement de ces microorganismes. Ils sont répartis sur les différentes zones écologiques et climatologiques de l'Algérie (Sédiments marins et sol de la zone humide, semi-aride, aride et saharien). Trois méthodes d'isolement sont utilisées à savoir la technique d'isolement des myxobactéries à l'aide de papier filtre, la méthode des séquences d'*Escherichia coli* et la méthode des granulés de fumier de lapin. Treize isolats sont obtenus et caractérisés phénotypiquement comme étant des myxobactéries. Trois parmi eux sont retenus pour l'étude de l'activité antibactérienne. Cette dernière est réalisée par la méthode de Fleming (contacte directe entre la souche productrice et la souche indicatrice) et par la technique des cylindres d'agar. Cinq bactéries indicatrices sont utilisées dont deux à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*) et trois à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Montevideo*). Deux isolats sur trois ont montré une activité antibactérienne avec des résultats intéressants marqués par la souche Myx 2.5 qui a inhibé toutes les souches indicatrices à l'exception de *Staphylococcus aureus*. L'activité antagoniste exercée par cet isolat s'avère très importante avec des zones d'inhibitions allant de 22 à 34 millimètres de diamètre. D'après ces résultats préliminaires, les sédiments marins semblent des sources intéressantes pour l'obtention de souches et/ou molécules nouvelles.

Mots clés : Myxobactéries ; Sol Algérien ; Molécule bioactifs ; Activité antibactérienne.

Summary

The constant evolution of bacterial resistance to antibiotics is increasingly rapid, causing deficiencies in antibacterial therapy, or therapeutic failures. These reasons are aimed at looking for new molecules with antibacterial activity. In this research, we were interested in finding a myxobacteria that produce bioactive molecules from different natural ecosystems. Nine sampling sites are selected to perform the isolation of these microorganisms. They are spread over the different ecological and climatological zones of Algeria (marine sediments and soil of the wetland, semi-arid, arid and Saharan). Three methods of isolation have been used: the technique of Inoculation of filter paper with soil, the method of Baiting with *Escherichia coli* streaks and the method of Baiting with dung pellets. Thirteen isolates are obtained and phenotypically characterized as myxobacteria. Three of them are selected for the study of antibacterial activity. The latter is carried out by the Fleming method (direct contact between the producing and the indicator strain) and by the technique of the agar cylinders. Five indicator bacteria are used including two gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*) and three Gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Montevideo*). Two out of three isolates showed antibacterial activity with interesting results marked by the Myx 2.5 strain that inhibited all indicator strains except *Staphylococcus aureus*. The antagonistic activity exerted by this isolate is very important with areas of inhibitions ranging from 22 to 34 millimeters in diameter. Based on these preliminary results, marine sediments appear to be attractive sources for obtaining new strains and/or molecules.

Key words: Myxobacteria, Soil Algerian, Bioactive molecules, antibacterial activity.

ملخص

مقاومة البكتيريا ضد المضادات الحيوية دائما في تطور مستمر مما يؤدي إلى فشل العلاج بالمضادات الحيوية. وهذا ما كان سبب من أجل البحث عن مركبات جديدة ذات نشاط حيوي. من خلال هذا العمل تم تركيز الإهتمام في البحث عن الميكسوبكتيريا المنتجة لمركبات مضادة للبكتيريا من خلال مختلف النظم الإيكولوجية الطبيعية. تم اختيار تسعة مواقع لأخذ العينات لعزل هذه الكائنات الحية الدقيقة والمتوزعة في مختلف المناطق الإيكولوجية والمناخية في الجزائر (الرواسب البحرية وتربة الأراضي الرطبة وشبه القاحلة والقاحلة والصحراوية). تم استخدام ثلاث طرق لعملية العزل: عزل الميكسوبكتيريا عن طريق ورق الترشيح السليلوزي، عن طريق قطع خلايا *Escherichia coli* وعن طريق كريات سماد الأرنب. تم الحصول على ثلاثة عشر عزلات من الميكسوبكتيريا المتعرف عليها من خلال مظهرها الخارجي. تم اختيار ثلاثة منهم لاختبار نشاط المضاد الحيوي. يتم تنفيذ هذا الأخير من خلال طريقة فليمنغ (الإتصال المباشر بين السلالة المنتجة والسلالة الممرضة) وتقنية أسطوانات الأجار. تم استخدام خمسة بكتيريا ممرضة: إثنين منها إيجابية الغرام (*Staphylococcus aureus et Bacillus cereus*) وثلاثة منها سلبية الغرام (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella Montevideo*). أظهرت إثنان من أصل ثلاث عزلات أن لديهم نشاط حيوي مع نتائج مثيرة للإهتمام تمثلت في السلالة Myx2.5 التي تمكنت من منع نمو السلالات الممرضة باستثناء *Staphylococcus aureus* النشاط التنافسي الذي يمارسه هذا العزل مهم جدا مع مناطق التثبيط التي تتراوح بين 22 إلى 34 ملم في القطر. إستنادا إلى هذه النتائج الأولية يبدو أن الرواسب البحرية هي مصادر مهمة للحصول على سلالات و/أو مركبات جديدة.

الكلمات المفتاحية: الميكسوبكتيريا; التراب الجزائري؛ المركبات البيولوجية النشطة؛ نشاط مضاد للبكتيريا

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : degré Celsius

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : Acides Ribonucléiques Ribosomaux

ATCC : American Type Culture Collection.

AW : activité d'eau

CaCl₂ · 2H₂O : chlorure de calcium deux fois hydraté

CYB : CY Bouillon

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

E. coli : Escherichia coli

FeCl : Chlorure de fer

g : Gramme

h : heure

K₂HPO₄ : hydrogénophosphate de potassium

KN0₃ : Nitrate de potassium

Kpb : Kilo pair de base

MH : Mueller Hinton

LB : Laureat Bertani

LDC : la lysine décarboxylase

m : mètre

M : Molaire

MgSO₄ : sulfate de magnésium

MIC : Concentration minimale d'inhibition

min : Minute

ml : millilitre

MnCl₂ 7H₂O : chlorure de manganèse sept fois hydraté

MnSO₄ 7H₂O : sulfate de manganèse sept fois hydraté

Mpb: Mille pair de base

Mx. xanthus : *Myxococcus xanthus*

Na Cl : chlorure de sodium

NH₄⁺: Ammonium

NO₃⁻: Nitrate

ONPG : L'orthonitrophényl-β-galactoside

pH : Potentiel Hydrogène

SDT : Tests de dilution en série

ST21CX : Stan21 cycloheximide

TDA : Tryptophane désaminase

UFC : Unité Faisant Colonie.

UFC : Unités Formant Colonie

VP : Voges–Proskauer

WCXA : Water Cycloheximide Agar

µg/ml : Microgramme/ millilitre

µl : Microlitre

Liste des figures	
Figure 01 : Classification phylogénétique des myxobactéries	05
Figure 02 : Présence de myxobactéries sur des plaques d'agar	06
Figure 03 : Souches modérément thermophiles de <i>Sorangium</i> sur l'agar VY/2	08
Figure 04 : Souches de type myxobactérienne marin sur les plaques d'agar	11
Figure 05 : Morphogenèse cellulaire dans les myxobactéries, montré avec <i>Stigmatella aurantiaca</i> comme exemple	12
Figure 06 : <i>Myxococcus xanthus</i> cycle cellulaire multicellulaire.	14
Figure 07 : Mécanisme d'action des antibiotiques	17
Figure 08 : Principaux sites d'action des antibiotiques chez les bactéries	19
Figure 09 : La structure chimique de Myxopyronin A et B	22
Figure 10 : La structure chimique de Coralopyronine	22
Figure 11 : La structure chimique d'Angiolam A	23
Figure 12 : La structure chimique de Myxovalargine A	23
Figure 13 : La structure chimique d'aurachins	24
Figure 14 : La structure chimique de thuggacine	24
Figure 15 : La structure chimique de Carolactone	25
Figure 16 : Procédure d'isolement commune pour les myxobactéries	29
Figure 17 : <i>Escherichia coli</i> vue au microscope électronique et coloré artificiellement	34
Figure 18 : <i>Staphylococcus aureus</i> vue au microscope électronique et coloré artificiellement	35
Figure 19 : <i>pseudomonas aeruginosa</i> vue au microscope électronique et coloré artificiellement	35
Figure 20 : <i>Salmonella montevideo</i> vue au microscope électronique et coloré artificiellement	35
Figure 21 : <i>Bacillus cereus</i> vue au microscope électronique et coloré artificiellement	36
Figure 22 : Plaque de biotest	40
Figure 23 : les isolats myxobactériennes dégradant la cellulose sur le milieu Stan21CX.	42
Figure 24 : l'isolement des myxobactéries à l'aide des séquences d' <i>E.coli</i> vivante sur le milieu WCX.	44

Figure 25 : Isolement du sol par appâtage avec des granulés de fumier.	45
Figure 26 : activité protéolytique sécrétée par Myx9 et les souches purifiées de sol Sedra.	49
Figure 27 : Observations microscopiques des trois myxobactéries sélectionnées après une coloration de Gram avec un grossissement (G : x100) A : Myx2.5, B : MyxA, C : Myx10	51
Figure 28 : Résultats de test de catalase pour identifier les deux isolats : MyxA et Myx10.	52
Figure 29 : Résultats de test oxydase pour identifier les isolats : MyxA, Myx2.5, Myx10.	52
Figure 30 : Un diagramme représente le diamètre des zones d'inhibition des trois isolats contre les cinq souches pathogènes tests (Technique de Fleming).	54
Figure 31 : la zone inhibitrice de l'isolat Myx2.5 contre les souches pathogènes tests (Technique de Fleming).	55
Figure 32 : Un diagramme représente le diamètre des zones d'inhibition des trois isolats contre les cinq souches pathogènes tests (Technique de cylindres d'agar).	57
Figure 33 : L'activité antibactérienne de deux isolats : MyxA et Myx2.5 contre les souches indicatrices (Technique de cylindres d'agar).	58

Liste des tableaux

Tableau 01 : Sources pratiques et préférentielles pour l'isolement de différentes Myxobactéries ^a .	10
Tableau 02 : Principaux antibiotiques classés selon leur site d'action.	20
Tableau 03 : Caractéristiques des souches testées.	33
Tableau 04 : L'origine des isolats myxobactériennes cellulotytique des 9 échantillons.	41
Tableau 05 : L'origine des isolats myxobactériennes à l'aide des séquences d' <i>E.coli</i> vivante des 9 échantillons.	43
Tableau 06 : L'origine des souches myxobactériennes isolées par méthode d'appâtage avec les granulés de fumier sur le milieu CY.	46
Tableau 07 : Aspect macroscopique et caractères culturaux des trois isolats sélectionnés.	50
Tableau 08 : caractéristiques biochimiques des trois isolats myxobactériennes.	51
Tableau 09 : Résultat de l'activité antibactérienne des trois isolats contre les cinq souches indicatrices déterminées par la méthode de Fleming.	53
Tableau 10 : Résultat de l'activité antibactérienne des trois isolats contre les cinq souches indicatrices déterminées par la méthode de cylindres d'agar.	56

Table des matières

Introduction.....	1
-------------------	---

Synthèse bibliographique

Les Myxobactéries

I-1 Généralités	3
I-2 Historique :.....	3
I-3 Taxonomie :	4
I-4 Caractères morphologiques :.....	5
I-5 Conditions de croissance des myxobactéries :	6
I-5-1 L'oxygène :	6
I-5-2 Le pH :	6
I-5-3 La température :	7
I-5-4 La tolérance au sel :	8
I-6 Nutrition et métabolisme énergétique :	8
I-6-1 Le premier groupe :	9
I-6-2 Deuxième groupe :	9
I-7 Ecologie et distribution dans la nature :	9
I-7-1 Les myxobactéries sont essentiellement des bactéries du sol :.....	10
I-7-2 Les myxobactéries marines :	11
I-7-2-1 Milieux marins / salins :	11
I-8 CYCLE DE VIE DE MYXOBACTÉRIES :	11
I-8-1 <i>Myxococcus xanthus</i> , Un modèle pour les comportements coopératifs aux multiforme chez les bactéries :	12
I-9 Biologie moléculaire du myxobactéries :	14
I-10 Conservation :	15

Les antibiotiques

II-1 Généralités :	16
II-2 Classification des antibiotiques :	17
II-3 Les principales familles des antibiotiques :	17
II-3-1 Familles des β -lactamines :	17
II-3-2 Familles des glycopeptides :	18
II-3-3 Familles des aminosides :	18

II-3-4 Familles des macrolides :	18
II-3-5 Familles des quinolones :	18
II-4 Mécanisme d'action de l'antibiotique.....	19
II-4-1 La paroi.....	19
II-4-2 La membrane cytoplasmique :	20
II-4-3 Le chromosome :	20
II-4-4 Le ribosome :	20
II-5 Les antibiotiques produits par les Myxobactéries :	20
II-5-1 Inhibiteurs de l'ARN polymérase bactérienne :	21
II-5-1-1 Myxopyronin :	21
II-5-1-2 Corallopyronine :	22
II-5-2 Inhibiteurs de la synthèse des protéines :	22
II-5-2-1 Angiolam A :	23
II-5-2-2 Myxovalargine :	23
II-5-3 Inhibiteurs de la respiration :	23
II-5-3-1 Aurachins :	24
II-5-3-2 Thuggacine :	24
II-5-4 Inhibiteurs de la formation de biofilms :	25
II-5-4-1 Carolactone :	25

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

III-1 Objectif :	26
III-2 Zone d'échantillonnage :	27
III-2-1 Collecte et traitement des échantillons :	27
III-3 Méthodes d'isolement	28
III-3-1 Isolement du sol par appâtage avec des granulés de fumier :	28
III-3-2 Méthode d'isolement à l'aide des séquences d' <i>E.coli</i> :	28
III-3-3 Isolement du sol par appâtage à l'aide des stries <i>Escherichia coli</i> :	29
III-3-4 Isolement des myxobactéries à l'aide de papier filtre :	29
III-4 Purification des isolats de myxobactéries :	30
III-5 Vérification de la pureté des souches :	30
III-5-1 Macromorphologie et caractères cultureux :	30
III-6 Méthodes de conservation :	31

III-7 Recherche de l'activité antibactérienne :	32
III-7-1 Souches bactériennes tests :	32
III-7-1-1 Revivification des bactéries testent :	36
III-7-2 Criblage des myxobactéries pour déterminer leur activité antibiotique.....	37
III-7-2-1 Méthode de Fleming :	37
III-7-2-2 Technique des cylindres d'agar :	37
III-8 Extraction des métabolites secondaires	37
III-8-1 Extraction des métabolites secondaires de fermentation sur milieu liquide.....	37
III-8-2 Test pour l'activité antibiotique	38
III-8-1 Analyse de la production des métabolites secondaire	38
III-8-2 Test de dilution en série	38
III-8-2-1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice sur microplaque.....	38
III-8-2-2 Préparation de l'inoculum bactérienne	39
III-8-2-3 Préparation et inoculation de la microplaque.....	39

Résultats et Discussion

IV-1 Isolement des myxobactéries :	41
IV-1-1 Isolement des Myxobactéries cellulolytique :.....	41
IV-1-2 Isolement des Myxobactéries bactériolytiques :	42
IV-1-3 Isolement par appâtage avec des granulés de fumier de lapin	44
IV-2 Purification des isolats de myxobactéries :	45
IV-3 Caractéristiques macroscopiques des isolats :	50
IV-4 Caractéristiques microscopiques des isolats :	51
IV-5 Réaction de catalase et oxydase :	51
IV-6 Activité antibactérienne :	53
IV-6 -1 Technique de Fleming :	53
IV-6 -2 Technique de cylindres d'agar :	56
Conclusion et perspectives	59
Référence bibliographique.....	61
Annexe	
Résumé	

Introduction

Introduction

Les procaryotes continuent de fournir des pistes importantes dans la recherche de produits naturels bioactifs d'importance médicale. Les principaux producteurs de métabolites secondaires parmi les bactéries sont les Actinomycètes, *Bacillus* et *Pseudomonas* (**Kaur et al, 2018**). Les myxobactéries sont apparues comme une source prometteuse de produits naturels qui présentent des structures et des activités biologiques très diverses, dont l'antibiotique, antiviral, antifongique, ou l'activité anticancéreuse (**Krug et al, 2008 ; Mohr et al, 2017**).

Les métabolites secondaires microbiens s'élèvent à environ 50 000 composés connus avec les deux contributeurs les plus remarquables étant streptomycètes et myxobactéries (**Gregory, 2019**). Les myxobactéries ont été considérées comme des « usines de microbe » pour les métabolites secondaires actifs, parce qu'elles ont un grand potentiel en tant que source prolifique de nouveaux médicaments pour les programmes de découverte de médicaments. Ils peuvent produire plus de 100 types de métabolites secondaires avec des structures et des fonctions uniques, et plus de 600 types de nouveaux analogues (**Zhang et al, 2013**).

Leurs métabolites secondaires présentent des éléments structurels qui ne sont pas couramment produits par d'autres microbes tels que des hybrides inhabituels de polyketides et de peptides non ribosomiques. En fait, environ 40 % des composés myxobactériens décrits représentent de nouvelles structures chimiques. L'espace chimique du métabolisme de myxobactérie est rare tant dans la diversité que dans les activités biologiques. Le dépistage des myxobactéries pour la production de métabolites secondaire n'a été établi que dans quelques laboratoires microbiologiques (**Mandelshtam, 2016**) grâce à la difficulté de culture et de manipulation génétique qui entravent l'exploitation du potentiel biosynthétique de nombreuses espèces (**Krug et al, 2008**). En raison de ce fait, seulement environ 5% de tous les composés connus des microorganismes ont été attribués aux myxobactéries en 2003.

Par conséquent, il serait d'une grande valeur économique potentielle pour améliorer la capacité d'isolement de nouvelles myxobactéries, afin de fournir plus de souches pour le dépistage et le développement des médicaments (**Zhang et al, 2013**).

Malheureusement, l'étude des myxobactéries n'a pas attiré l'attention des microbiologistes Algériens. En effet, il n'y a pas d'études en littérature concernant les Myxobactéries Algériennes.

En tenant compte de l'introduction ci-dessus, les objectifs de la présente étude étaient d'isoler les myxobactéries de certaines sources naturelles Algériennes, d'examiner les isolats pour des activités antibactériennes et de caractériser les isolats prometteurs.

Synthèse

bibliographique

Les Myxobactéries

I-1 Généralités

Les myxobactéries ont été définies comme étant des bactéries Gram négatives de taille relativement importante (0,6–1,2 sur 3–15 µm) ayant le plus grand génome de toutes les bactéries (9500–10 000 kpb) avec un G+C (~70%) élevé (**Eied, 2013**) Les myxobactéries ont un aspect particulier de leur cycle de vie est leur différenciation morphologique aboutissant au développement de fructifications complexes (**Gerth et al,2003**).

Elles sont également souvent décrites comme des «microprédateurs», car ils sont capables de se nourrir d'autres organismes vivants tels que d'autres bactéries et levures Pour cela, ils excrètent une variété d'enzymes lytiques qui catalysent la lyse des cellules «victimes» et également digérer ensuite les protéines, lipides et acides nucléiques libérés (**Velicer et Vos, 2009**).

Les myxobactéries ont été définies comme étant des bactéries Gram négatives de taille relativement importante (0,6–1,2 sur 3–15 µm) ayant le plus grand génome de toutes les bactéries (9500–10 000 kpb) avec un G+C (~70%) élevé ,(**Eied,2013**) Les myxobactéries ont un aspect particulier de leur cycle de vie est leur différenciation morphologique aboutissant au développement de fructifications complexes (**Gerth et al,2003**).

Elles sont également souvent décrites comme des «microprédateurs», car ils sont capables de se nourrir d'autres organismes vivants tels que d'autres bactéries et levures Pour cela, ils excrètent une variété d'enzymes lytiques qui catalysent la lyse des cellules «victimes» et également digérer ensuite les protéines, lipides et acides nucléiques libérés (**Velicer et Vos, 2009**).

I-2 Historique :

La premier myxobactérie, *Polyangium vitellinum*, a été découvert et nommé par le botaniste allemand H.F. Link en 1809 qui considérait le corps fructifère comme un gastromycète. En 1857, le biologiste britannique M.J. Berkeley à découvert et nommé deux autres genres et espèces, *Stigmatella aurantiaca* et *Chondromyces crocatus* qu'il classé comme hyphomycètes. en 1892, Le botaniste américain Roland Thaxter a été le premier à identifier ces espèces comme myxobactéries et décrire leurs cycles de vie. Plusieurs études sur les myxobactéries ont suivi depuis le début du 20e siècle quatre études assez volumineuses sur les myxobactéries ont été publiées (Baur, 1905 ; Quehl, 1906 ; Vahle, 1910 ; Kofler, 1913) (**Dawid, 2000**). Ces articles sont pleins d'observations

intéressantes et de méthodes pour l'isolement et l'étude des myxobactéries. Dans les décennies suivantes, la recherche a été confinée principalement aux questions taxonomiques, écologiques et morphologiques (Jahn, 1911, 1924 ; Krzemieniewska et Krzemieniewski, 1926, 1927a, 1927b, 1930). Pendant cette période, de nouvelles espèces ont été découvertes et la large distribution des myxobactéries ont été reconnues. Une importante percée a été la découverte par Dworkin et Gibson (1964) il a conduit à une longue série d'études sur les aspects morphologiques, physiologiques et biochimiques, les événements qui se produisent pendant la formation induite de myxospores et génétique moléculaire par Kaiser et ses collègues. *Myxococcus xanthus* est devenu l'objet central et le mieux étudié de la recherche myxobactérienne. Un nouveau champ a été ouvert par la découverte de métabolites secondaires biologiquement actifs par Reichenbach et ses collègues (1984, 1988, 1989) (**Reichenbach et Dworkin, 1992**).

I-3 Taxonomie :

Les myxobactéries appartiennent au groupe de protéobactéries, La taxonomie des myxobactéries basées sur leurs analyses de séquence de gènes ARNr 16S et corrélation des acides gras et de la phylogénie et construire L'ordre Myxococcales. L'ordre se compose de 55 espèces dont 28 genres (figure 01). Ces chiffres devraient augmenter à l'avenir après la représentation complète des isolats de romans encore à identifier/publicés à partir d'échantillons environnementaux (**Harwani, 2017**).

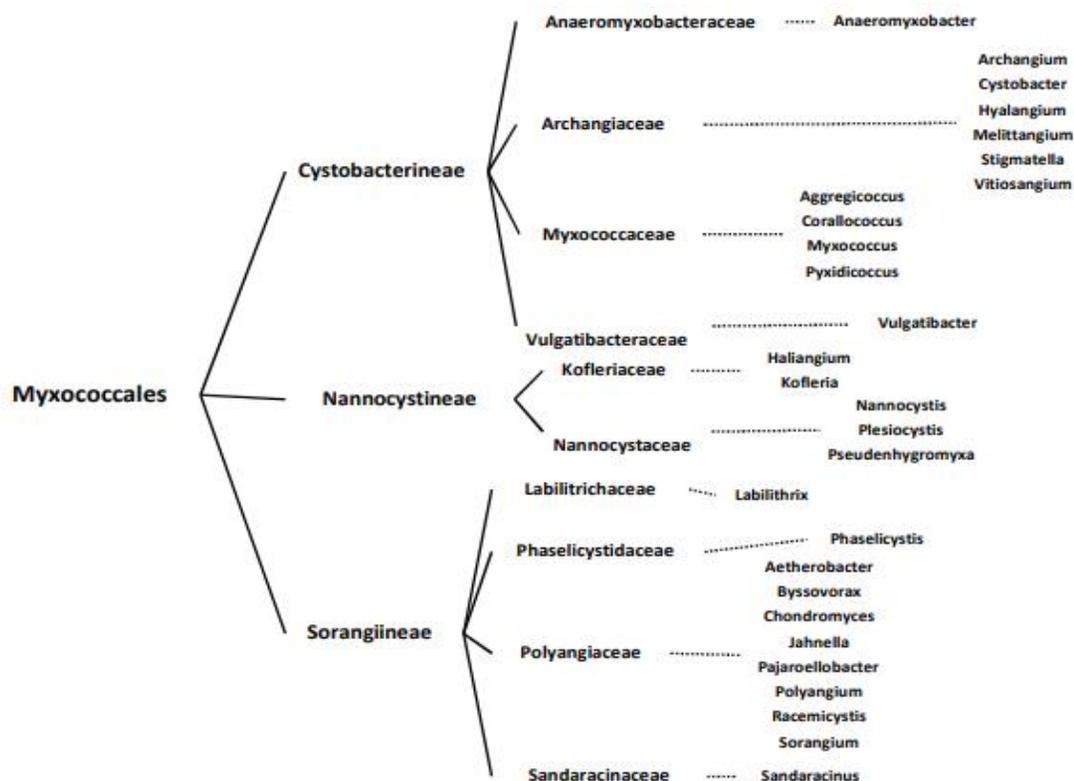


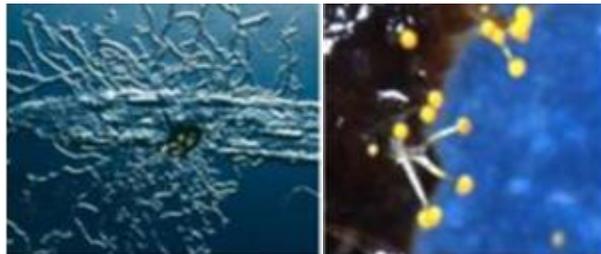
Figure 01 : Classification phylogénétique des myxobactéries (Mohr, 2018).

I-4 Caractères morphologiques :

En général, les myxobactéries présentent un complexe cycle de vie. Les cellules végétatives se propagent à la surface en glissant sous forme de colonie d'essaims. Lorsque les nutriments sont rares, les cellules s'agrègent et forment des fructifications multicellulaires, montrant une morphologie variée utilisée pour la classification taxonomique. Dans le corps fructifère (Figure 2), les cellules modifient leur forme en cellules végétatives de forme bâtonnets et créent des myxospores enfermées dans une paroi cellulaire visqueuse (Figure 02). Cette forme de vie assure à la colonie de survivre dans des conditions environnementales extrêmes (Nadmid, 2015). Les myxospores sont des cellules asexuées et dormantes qui peuvent survivre à des conditions environnementales hostiles pendant de nombreuses années (Shimkets, 1990).

Le stéréotype fréquemment appliqué aux myxobactéries est qu'elles n'ont pas de paroi cellulaire rigide, ou qu'elles n'ont pas une paroi cellulaire complètement (Dworkin, 1966). Les cellules sont enveloppées dans une paroi cellulaire de plusieurs couches y compris une mince couche de peptidoglycane. Le peptidoglycane semble être organisé en patches. La membrane extérieure se

compose de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharides. La constitution lipopolysaccharide de nombreuses myxobactéries est similaire à celle de la plupart des eubactéries. Outre le mannose, ils contiennent du galactose, de la glucosamine et d'autres sucres. L'acide ketodeoxyoctanoic est toujours présent, alors que les heptoses ne se produisent pas (**Dawid, 2000**).



A) Essaim

B) Corps de fructification

Figure 02 : Présence de myxobactéries sur des plaques d'agar (**Mazaikina., 2016**).

I-5 Conditions de croissance des myxobactéries :

Plusieurs facteurs environnementaux conditionnent la croissance des myxobactéries :

I-5-1 L'oxygène :

Toutes les myxobactéries connues sont strictement aérobies et vivent dans les couches les plus hautes du sol (**Reichenbach, 1999**).

A une exception près : Le genre facultatif-anaérobie *Anaeromyxobacter* comprend une espèce, *A. dehalogenans*. La souche de type a été isolée des sédiments du cours d'eau. (**Mandelshtam, 2016**).

I-5-2 Le pH :

La gamme de pH pour la croissance de la majorité des myxobactéries est assez étroite, environ 6,5–8,5. Par conséquent, ils sont communs dans les sols de pH 6–8 (pH neutre à légèrement alcalin). Cependant, les habitats acides ou alcalins semblent également convenir aux myxobactéries (**Mohr, 2018**).

Lorsque les conditions autrement favorables telles que l'humidité et la température suffisamment élevées, les myxobactéries ont également été isolées des sols avec un pH en vrai inférieur à 5 (**Reichenbach et Dworkin, 1992**).

I-5-3 La température :

Presque toutes les myxobactéries poussent bien à 30°C, bien que leur plage de température de croissance soit beaucoup plus large se situent entre 4 et 44°C (**Mohr, 2018**)

De nombreuses souches sont psychrotrophiques et poussent, quoique lentement, à basse température, par exemple au réfrigérateur à 4-8°C. En outre, l'isolement à 10°C a apporté de nombreuses myxobactéries différentes. Le temps d'incubation pour isoler les psychrophiles peut tout simplement avoir été trop court. Les cellules végétatives survivent également au point de congélation mais ne vivent plus longtemps qu'à des températures inférieures de -50°C à -60°C. En laboratoire, la plage de température utile pour cultiver les myxobactéries est de 28 à 34°C, avec des temps de production compris entre 4 et 14h (**Reichenbach, 1999**).

Dans la nature les cellules végétatives sont tuées à des températures supérieures à 45°C, mais les myxospores suspendues dans l'eau tolèrent 58-60°C, qui peut être utilisées pour purifier les souches pendant l'isolement. Les myxospores sèches peuvent survivre à des températures beaucoup plus élevées. L'obtention des cultures de culture de fruits de divers genres qui avaient été chauffés sur du papier filtre dans le four à 140°C pour 30min, dans certains cas, même pour 45min d'isolement (**Reichenbach et Dworkin, 1992**).

Les myxobactéries thermophiles modérées des *cystobacterineae* et des *sorangineae*-sous-ordres, qui ont augmenté très rapidement à des températures de 42°C-44°C, ont été isolées des échantillons de sol des climats semi-amarrés et chauds par Gerth et Muller (**figure 03**). Une souche s'est même développée à 48°C (**Mohr, 2018**).

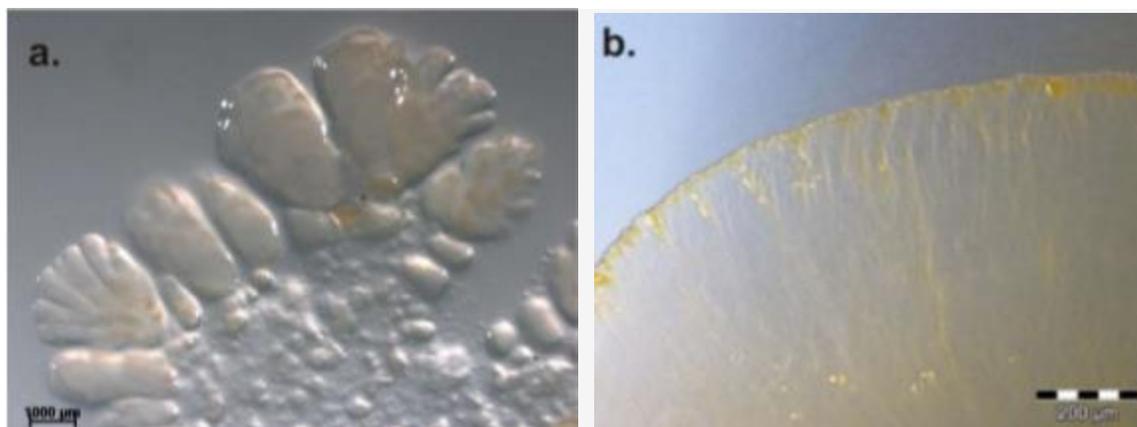


Figure 03 : Souches modérément thermophiles de *Sorangium* sur l'agar VY/2. a) GT47 et b) GT 41, 552 isolés par le Dr K. Gerth. (Mohr, 2018).

I-5-4 La tolérance au sel :

La tolérance au sel des myxobactéries est généralement faible (Mohr, 2018).

En 2013, **Zhang et al** ont isolé cinquante-huit myxobactéries terrestres et tolérantes au sel des sols salins-alcalins prélevés au Xinjiang, en Chine. Les auteurs ont identifié des espèces de *Myxococcus*, *Cystobacter*, *Corallocooccus*, *Sorangium*, *Nannocystis* et *Polyangium*. Ils ont rapporté que toutes les souches se développaient mieux avec 1% de NaCl que sans sel ; certaines souches de *Myxococcus* se développent même avec 2% de NaCl (Zhang et al, 2013).

Mais, jusqu'à récemment, toutes les souches ainsi obtenues n'étaient pas halotolérantes. Les sols des marais salants ou de certains habitats désertiques à forte teneur en sel doivent être dessalés avant que les myxobactéries puissent en être isolées. (Apparemment, certaines myxobactéries tolèrent le sel mieux que d'autres (Reichenbach, 1999).

I-6 Nutrition et métabolisme énergétique :

Toutes les myxobactéries se décomposent et consomment ensuite diverses macromolécules, leur métabolisme peut être divisé en deux groupes distincts (en mettant les *Anaeromyxobacter dehalogenans* anaérobies facultatifs) :

I-6-1 Le premier groupe :

Peut-être caractérisé comme des décomposeurs de cellulose. Leur production de cellulase permet de bien se nourrir également de cellulose et de monomères de sucre, comme le glucose. Quant à la source d'azote, ce groupe de myxobactéries est capable d'obtenir de l'azote à la fois sous des formes organiques (par exemple la peptone) et inorganiques (NH₄⁺ ou NO₃⁻) (**Mohr, 2018**).

I-6-2 Deuxième groupe :

La majorité des myxobactéries appartiennent cependant au deuxième groupe métabolique qui est caractérisé par la dépendance des bactéries vis-à-vis des acides aminés comme seule forme acceptable d'azote et source préférable de carbone et d'énergie.

Quant aux autres nutriments, leur absorption est assurée par la décomposition enzymatique des composés avec des nucléases, des lipases, des glycanases et des enzymes lytiques de la paroi cellulaire. La décomposition de la cellulose n'existe pas dans ce groupe, mais de nombreuses myxobactéries sont capables de décomposer l'amidon et bon nombre d'entre elles sont de puissants dégradeurs de la chitine. Cependant, les espèces de *Myxococcus*, par exemple, sont inefficaces dans l'utilisation du sucre comme principale source de carbone.

Ce groupe de myxobactéries repose sur la lyse et la consommation d'autres cellules bactériennes. Pour cette raison, le terme «micro prédateur» a été inventé pour ce type de myxobactéries. Cependant, le comportement «prédateur» n'est pas obligatoire et les myxobactéries de ce groupe peuvent agir comme piégeurs (**Mandelstam, 2016**).

I-7 Ecologie et distribution dans la nature :

➤ Les myxobactéries sont des organismes très communs et ubiquitaires :

Les principaux habitats des myxobactéries sont le sol, les excréments (**Reichenbach et Dworkin, 1992**), le matériel végétal en décomposition, y compris le bois pourri et l'écorce des arbres morts et vivants, les lichens et les insectes en décomposition et les excréments ; en particulier de certains mammifères herbivores ; tels que les lapins sauvages, les lièvres, les cerfs, les moutons et les chèvres, des sources communes pour différentes myxobactéries sont données dans le (**Tableau 01**). La bouse de lapin est une source classique pour l'isolement des myxobactéries (**Reichenbach, 1999**).

Presque tous les myxobactéries sont des «micro prédateurs» et sont attirés par des habitats riches en communautés microbiennes, qu'ils peuvent coloniser comme substrats secondaires. De plus, ils se trouvent parfois dans des endroits où ils ne peuvent probablement pas vivre, mais où leurs stades de repos peuvent survivre pendant un certain temps (**Reichenbach et Dworkin, 1992**).

Tableau 01 : Sources pratiques et préférentielles pour l'isolement de différentes Myxobactéries^a (**Reichenbach et Dworkin, 1992**).

Substrat	Les espèces myxobactériennes ^b
Sol	<i>Nannocystis exedens</i> , ⁵ <i>Sorangium cellulosum</i> , ⁴ <i>Archangium serpens</i> , ⁴ <i>Corallocooccus coraloides</i> , ⁴ <i>Polyangium</i> spp., ³ <i>Cystobacter</i> spp., ³ <i>Melittangium</i> spp., ³ <i>Myxococcus fulvus</i> , ² <i>Mx. Virescens</i> , ² <i>Mx. stipitatus</i> ²
Bouse d'herbivores	<i>Myxococcus fulvus</i> , ⁵ <i>Corallocooccus coraloides</i> , ⁵ <i>Mx. virescens</i> , ⁴ <i>Cystobacter fuscus</i> , ⁴ <i>Cb. ferrugineus</i> , ⁴ <i>Archangium serpens</i> , ⁴ <i>Nannocystis exedens</i> , ³ <i>Cb. violaceus</i> , ³ <i>Polyangium</i> spp., ³ <i>Stigmatella erecta</i> , ² <i>Mx. xanthus</i> , ² <i>Melittangium</i> spp., ² <i>Cb. Velatus</i> ¹
Écorce et bois pourri	<i>Stigmatella aurantiaca</i> , ⁴ <i>Chondromyces apiculatus</i> , ⁴ <i>Sorangium cellulosum</i> , ⁴ <i>Corallocooccus coraloides</i> , ⁴ <i>Myxococcus fulvus</i> , ³ <i>Cm. pediculatus</i> , ² <i>Haploangium</i> spp. ²

^aComme indiqué dans «Habitats», la fréquence des myxobactéries sur un substrat spécifique peut varier considérablement dans différents environnements. De plus, certaines espèces peuvent être sous-représentées à partir d'une certaine source car la technique d'isolement habituellement appliquée peut ne pas entraîner l'isolement de l'organisme particulier.

^bFréquence des espèces rencontrées : ⁵, ubiquitaire ; ⁴, très fréquente ; ³, modérément fréquente ; ², relativement rare ; ¹, rare.

I-7-1 Les myxobactéries sont essentiellement des bactéries du sol :

L'habitat typique des myxobactéries est le sol, des sables dunaires et désertiques au chernozem noir riche (**Reichenbach, 1999**). Des espèces de genres terrestres déjà connus, *l'Archangium*, le *Chondrocooccus* (*Corallocooccus*), le *Chondromyces*, le *Myxococcus* et le *Polyangium*, pourraient être cultivées (**Moh, 2018**).

I-7-2 Les myxobactéries marines :

Les myxobactéries ont été isolées de sources marines. Ils ont été trouvés à plusieurs reprises dans le sable et les débris prélevés dans la zone intertidale de l'océan Atlantique, et une fois même dans des échantillons prélevés à 50 m de profondeur autour de l'île de Helgoland (**Reichenbach, 1999**).

I-7-2-1 Milieux marins / salins :

En 1963, Brockman a observé des myxobactéries en train de fructifier (**figure 04**) dans des échantillons de sable provenant de la plage océanique de Caroline du Sud. Pas plus tard qu'en 2002 avec *Haliangium ochraceum* et *H. tepidum*, le premier genre myxobactérienne a été isolé et décrit à partir de marais salés côtiers. D'autres genres, détectés exclusivement dans les habitats marins comme *Plesiocystis*, *Enhygromyxa* et *Pseudenhygromyxa* (tous sous-ordre des *Nannocystineae*) (**Mohr, 2018**).

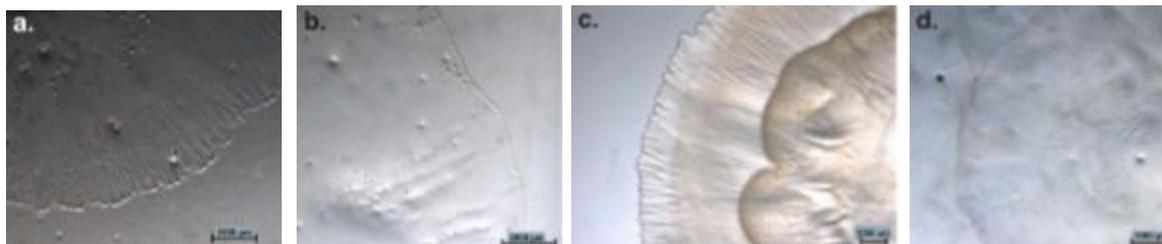


Figure 04 : Souches de type myxobactérienne marin sur les plaques d'agar. a) *Haliangium tepidum* (DSM 14436T) sur VY/2SWS, b) *Enhygromyxa salina* (DSM 15217T) sur VY/4SWS, c) *Pseudenhygromyxa salsuginis* (DSM 21377T) en 1102, d) *Plesiocystis pacifica* (DSM 14875T) sur VY/2SWS (**Mohr, 2018**).

I-8 CYCLE DE VIE DE MYXOBACTÉRIES :

La formation des corps fruitiers représente le cycle de vie le plus sophistiqué connu chez les procaryotes (**Mandelshtam, 2016**).

Dans des conditions de famine, les myxobactéries subissent un processus impressionnant de morphogénèse coopérative : les cellules végétatives s'agrègent et s'accumulent ainsi que la masse cellulaire qui en résulte se différencie en corps fruitier. Les corps fruités myxobactériennes montrent divers degrés de complexité, à la fois morphologiquement et structurellement. Ils se mesurent généralement entre 50 et 500 μm , ils peuvent donc être facilement vus à l'œil nu. Dans le corps fruitier en maturation ; une différenciation cellulaire a lieu au cours de laquelle les cellules

végétatives se transforment en myxospores courtes, grasses et optiquement réfractrices (**figure 05**). Les myxospores sont résistantes à la dessiccation et permettent à l'organisme de survivre à des conditions environnementales défavorables (**Reichenbach, 1992**).

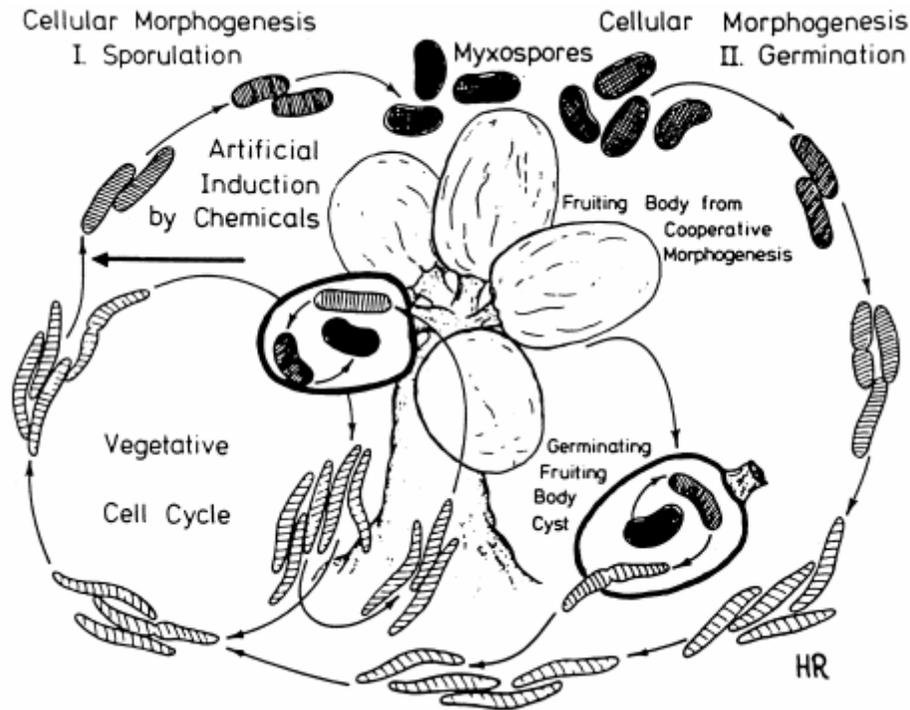


Figure 05 : Morphogénèse cellulaire dans les myxobactéries, montré avec *Stigmatella aurantiaca* comme exemple. Le corps fructifère et les cellules ne sont pas attirés par l'échelle (**Reichenbach, 1992**).

I-8-1 *Myxococcus xanthus*, Un modèle pour les comportements coopératifs aux multiformes chez les bactéries :

Le myxobactérium le mieux caractérisé est *Myxococcus xanthus*. Son cycle de vie comprend deux phases qui mettent en évidence la nature sociale de cet organisme : la prédation coopérative et le développement multicellulaire (**figure 06**). Les deux processus multicellulaires sont médiatisés par le mouvement coordonné des cellules à l'aide de deux systèmes de motilité, motilité individuelle (motilité aventureuse ou A-motilité) et motilité de groupe (motilité sociale ou S-motilité). En présence d'éléments nutritifs, les cellules se déplacent d'une manière coordonnée, formant des biofilms multicellulaires connus sous le nom d'essaims. Lorsque des essaims entrent en contact

avec des proies, des milliers de cellules finissent par pénétrer dans la colonie de proies et lyse les cellules.

Cette stratégie de prédation de groupe favorise l'essaim hydrolysant les biopolymères extracellulaires utilisant des exo-enzymes communs et, par conséquent, rendant l'utilisation la plus efficace possible des sources de nutrition disponibles. Cependant, après la famine, les cellules se déplaçant collectivement commencent un processus de développement et échangent des signaux chimiques extracellulaires ainsi que des signaux de contact physiques pour former des corps de fructification verticale de millimètre de long.

Ces structures multicellulaires matures, remplies de myxospores résistantes à l'environnement sont entourées de deux sous-populations différentes montrant la division du travail : une monocouche de tiges périphériques alignées qui sont distincts des cellules végétatives et des spores, et des cellules qui subissent une autolyse obligatoire altruiste par une mort cellulaire programmée par le développement. Dans les corps fruitiers, les myxospores sont fermement liées, donc sur la germination, toute la population reste ensemble pour créer une nouvelle communauté **(Muñoz et al, 2016)**.

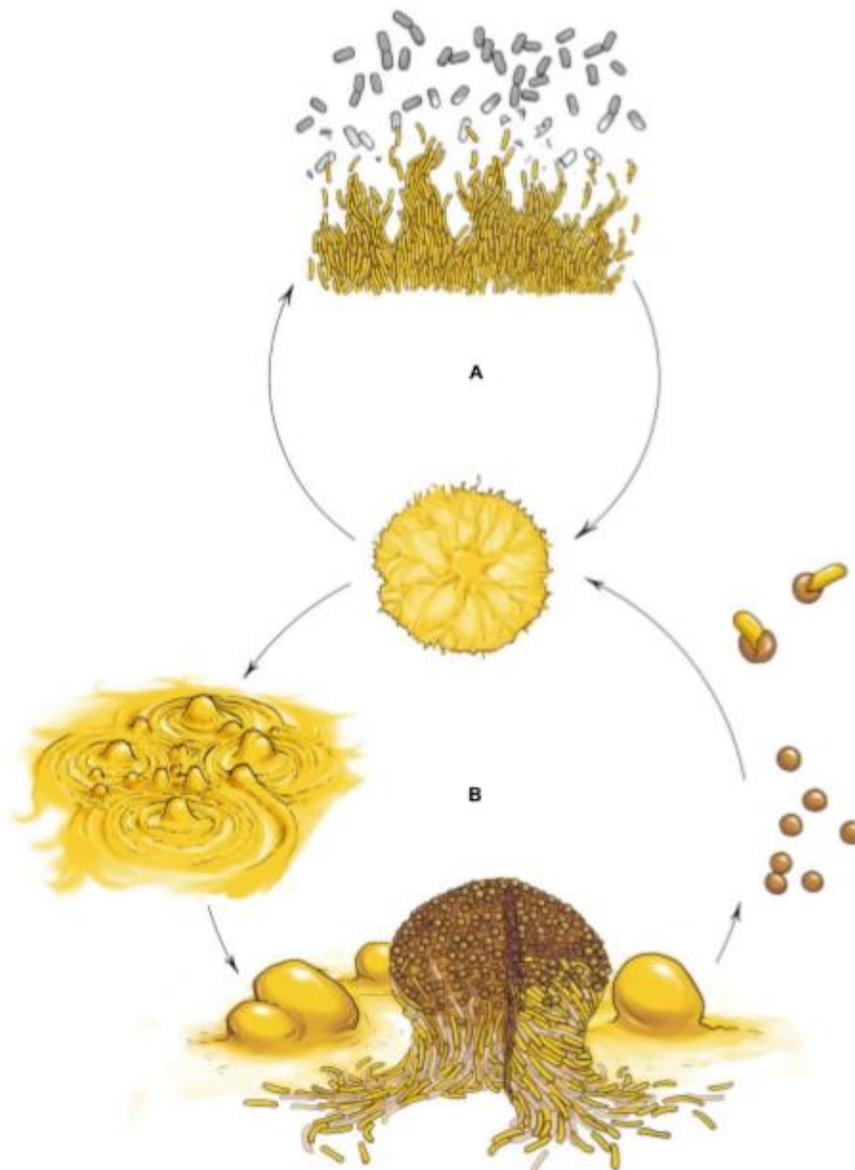


Figure 06 : *Myxococcus xanthus* cycle cellulaire multicellulaire (Muñoz et al, 2016).

(A) Croissance végétale en présence de nutriments.

(B) Cycle de développement lors de la famine.

I-9 Biologie moléculaire du myxobactéries :

Les myxobactéries contiennent les plus grands génomes de tous les procaryotes et le génome de *Sorangium cellulosum*, avec 413Mpb comme le plus grand génome bactérien séquencé à ce jour (Brinkhoff et al, 2012).

Selon **Renald Garcia (2010)**, les Corrélations documentées entre la morphologie et la phylogénie de myxobactérie basées sur l'analyse 16S rARN des 26 morphospecies reconnues et 54 souches (38 *Cystobacterineae*, 5 *Nannoysteneae*, et 11 *Sorangiiineae*). Beaucoup d'entrées Genbank utilisées dans leur étude, les espèces décrites sont maintenant placées dans 20 genres et six familles. Douze autres souches (neuf à *Sorangiiineae*, deux à *Nannocystineae*, et une *myxobacterium* anaérobie dans *Cystobacterineae*) ont également été inclus pour un total de 101 souches cultivées

Parmi les myxobactéries halophiles ; on a *Haliangium*, le génome de 9,4 Mb de *H. ochraceum* a été entièrement séquencé et publié et donc c'est le premier *myxobacterium* marin, dont le génome complet a été déterminé (**Mazaikina, 2016**).

Les myxobactéries ont une composition de base d'ADN de 67 à 71 mol% G-C et se trouvent donc près d'un extrême (**Shimkets et al, 1990**).

I-10 Conservation :

Pour une vie active, les myxobactéries ont bien sûr besoin d'eau. Les cellules végétatives sont plutôt sensibles à la dessiccation, de sorte que la lyophilisation n'est pas pratique pour leur préservation. En revanche, les myxospores sont complètement résistantes à la dessiccation et peuvent être maintenues au sec à température ambiante, par exemple dans les corps de fructification sur papier filtre, pendant 10-25 ans, la plus longue période qu'était tester jusqu'à présent. Il semble que le dépôt de quantités substantielles de tréhalose dans les myxospores de *Mx. xanthus* est responsable de la résistance à la dessiccation. Contrairement aux endospores, les myxospores ne conservent leur résistance qu'à des facteurs environnementaux nocifs à l'état sec (**Reichenbach, 1999**).

Les antibiotiques

II-1 Généralités :

On appelle antibiotique toute substance élaborée par un micro-organisme capable de tuer (agent bactéricide) ou d'inhiber la multiplication d'autres micro-organismes (agent bactériostatique) (**Labayle, 2001**). Souvent un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, en fonction de sa concentration (**figure 07**) (**Prescott, 2003**).

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.

Nous avons recours à leur utilisation de 2 manières selon leur spectre d'activité, c'est pour cela que l'on oppose les traitements documentés aux traitements dits probabilistes :

- Les traitements probabilistes sont administrés sans avoir une connaissance précise de la bactérie impliquée, ni même de sa sensibilité aux antibiotiques. On utilisera alors les antibiotiques dits à "large spectre", le choix de la molécule est basé sur les microorganismes infectants les plus probables avec un risque minimum d'allergie ou de toxicité.
- Les traitements documentés sont administrés après avoir déterminé la sensibilité des bactéries à l'antibiotique, ce qui sous-entend d'avoir préalablement isolé la bactérie en cause. Ce traitement peut être de première intention ou faire suite au traitement probabiliste une fois les données nécessaires connues (**Mangin, 2016**).

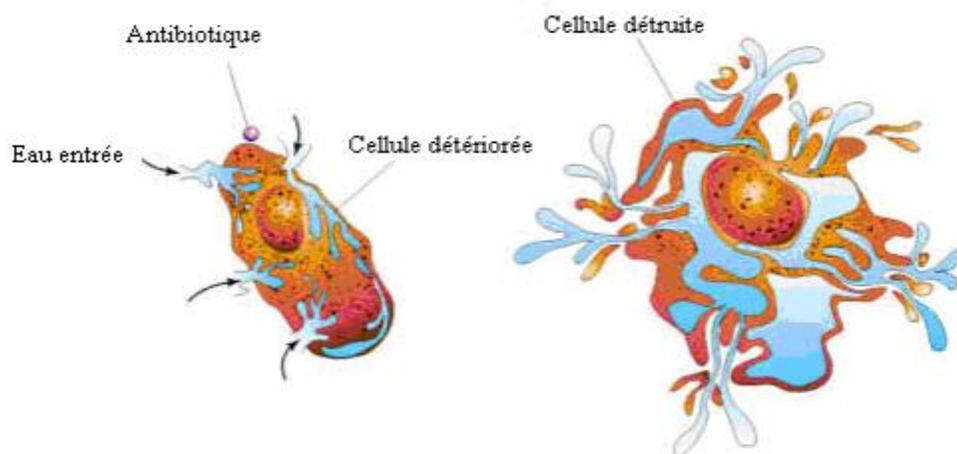


Figure 07 : Mécanisme d'action des antibiotiques (Mazri, 2009).

II-2 Classification des antibiotiques :

Pour mieux connaître les antibiotiques afin qu'ils soient utilisés à bon escient, on a procédé à leur classification selon certains critères :

- Les antibiotiques ayant une même structure chimique, à l'origine de leur mécanisme d'action, se classent dans une même famille.
- Au sein d'une même famille, les antibiotiques peuvent se différencier par leur spectre d'activité et sont réunis alors dans des groupes.
- Au sein d'un même groupe, l'activité antimicrobienne est identique mais les antibiotiques peuvent se différencier par leur propriété pharmacologique ou leur tolérance (Talbert et al, 2009).

II-3 Les principales familles des antibiotiques :

On a 5 grandes familles des antibiotiques :

II-3-1 Familles des β -lactamines :

Les bêta-lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus utilisée en antibiothérapie. Ils représentent une vaste famille d'antibiotiques bactéricides qui possèdent comme structure de base le cycle bêta-lactame (Laurent, 2009). Les β -lactamines sont des molécules cycliques qui interfèrent avec les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane (Cavallo et al, 2004).

II-3-2 Familles des glycopeptides :

Les deux seuls antibiotiques importants au glycopeptide actuellement disponibles sont la vancomycine et la téicoplanine (**Stephen et al, 2011**). Ces deux molécules n'agissent que sur les bactéries à Gram positif en inhibant la synthèse du peptidoglycane et donc la croissance des bactéries (**Amara et Boukhoursa, 2019**).

II-3-3 Familles des aminosides :

Leur structure est à base de sucres aminés, les principales molécules sont : Streptomycine, Gentamicine, Netilmicine, Tobramycine, Amikacine sont des antibiotiques bactéricides. Ils se fixent de façon irréversible sur les ribosomes des bactéries et inhibent la traduction en modifiant la conformation de la sous-unité 30S du ribosome procaryote en provoquant des erreurs de lecture de l'ARN messager (**Archambaud, 2009**) L'antibiotique le plus connu est la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* et la gentamycine produite par *Micromonospora purpurea* (**Demain et Lancini, 2006**).

II-3-4 Familles des macrolides :

Les macrolides sont des macrocycles lactoniques composés de : 14 atomes (Erythromycine, Roxithromycine, Clarithromycine) ,15 atomes (Azithromycine) ,16 atomes (Spiramycine, Josamycine, Midécamycine)

Ces molécules agissent par liaison réversible au niveau du site P de la sous unité 50S du ribosome bactérien. Cela entraîne un blocage du transfert du complexe peptidyl/ARNt du site P vers le site A, provoquant un arrêt de l'élongation de la chaîne peptidique et donc de la synthèse protéique (**Algoud ,2018**).

II-3-5 Familles des quinolones :

Elles sont réparties en deux groupes : les quinolones classiques, les fluoroquinolones. Elles agissent sur des enzymes réglant la conformation de l'ADN, les topo-isomérases (essentiellement les topo-isomérases II ou ADN gyrases).Elles sont bactéricides. Elles atteignent de bonnes concentrations intracellulaires dans les cellules eucaryotes (**Gouasmia et Hechachenia, 2015**).

II-4 Mécanisme d'action de l'antibiotique

A la différence des antiseptiques et des désinfectants, les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne. L'action d'un antibiotique est le résultat des interactions organisme-antibiotique d'une part et antibiotique-bactéries d'autre part, Pour résumer ces dernières, on peut dire que pour être actif, un antibiotique doit : Pénétrer jusqu'à sa cible bactérienne ; Ne pas être inactivé ; Être capable de se lier à sa cible (**Gaudy et Buxeraud, 2005**). Sans perturber le fonctionnement de Ces cellules ciblent (**Smaoui, 2010**).

La (**figure 08**) ci-dessous schématise les principaux sites d'action des antibiotiques dans une bactérie.

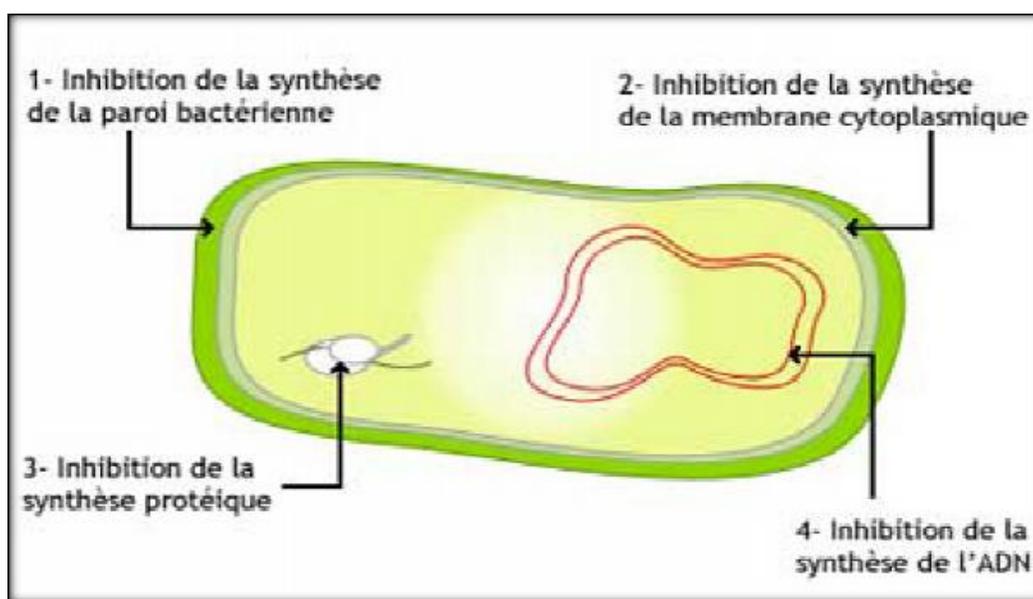


Figure 08 : Principaux sites d'action des antibiotiques chez les bactéries (**Meyer et al, 2004**).

II-4-1 La paroi

L'action des antibiotiques permet d'empêcher la synthèse de la transpeptidase (**Tableau 03**), qui joue un rôle importante dans l'assemblage du peptidoglycane de la paroi cellulaire. Ce qui entraîne la fragilisation de la paroi cellulaire, notamment chez les micro-organismes Gram positif. Les bactéries Gram négatives ont tendance à être moins sensibles car leur enveloppe

externe empêche l'antibiotique d'atteindre la couche de peptidoglycane de la cellule. Les β -lactamines fonctionnent de cette façon (Perry et al, 2004)

II-4-2 La membrane cytoplasmique :

Certains antibiotiques agissent grâce à des propriétés dites surfactantes. Cette propriété permet aux antibiotiques de s'insérer entre les phospholipides externes. Cela entraîne une augmentation anormale de la perméabilité membranaire, ce qui entraîne une fuite de substances intracellulaires à travers la membrane plasmique et la mort des bactéries. Les polymyxines fonctionnent selon ce mode d'action (Bousseboua, 2005).

II-4-3 Le chromosome :

La synthèse des ADN chromosomiques peuvent être inhibé par les quinolones (Benzeggouta, 2005). Ces antibiotiques inhibent l'ADN gyrase en bloquant le déroulement de l'ADN qui est une étape importante du démarrage de la réplication. Toutefois, les quinolones bloquent la réparation et la transcription de l'ADN en ARN messager (Prescott et al, 2007).

II-4-4 Le ribosome :

Les antibiotiques antibactériens qui inhibent la synthèse protéique (Tableau 02), se fixent aux ribosomes bactériens tels que les cyclines, les aminosides et les macrolides (Talbert et al, 2009). Les Aminosides fonctionnent selon ce mode d'action (Prescott et al, 2007).

Tableau 02 : Principaux antibiotiques classés selon leur site d'action (Figarella et al, 2007)

Site d'action	Paroi	Membrane	Chromosome	Ribosomes
Antibiotiques	Pénicilline Cyclosérine Bacitracine Novobiocine	Thyrothricine Polymyxine	Actinomycine Rifamycine Mitomycine Acide nalidixique	Aminosides Chloramphénicol Tétracycline

II-5 Les antibiotiques produits par les Myxobactéries :

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*, mais

s'est avéré toxique (Schäberle et al, 2014). En 1977, la première structure chimique d'un antibiotique myxobactérienne, l'ambruticine, a été publiée.

Au cours des 15 dernières années, les myxobactéries ont été montrées une source riche de nouveaux métabolites secondaires, de nombreux composés montrant des mécanismes d'action intéressants et parfois uniques (Reichenbach et al, 1988). Plus de 80 bases différentes structures et 350 variantes structurelles ont été identifiées à partir de myxobactéries, plaçant les myxobactéries dans la ligue avec *Pseudomonas* comme producteurs d'antibiotiques abondants, (Eied, 2013).

II-5-1 Inhibiteurs de l'ARN polymérase bactérienne :

Les ARN polymérase ADN-dépendantes sont des cibles bien connues des antimicrobiens. Ils sont essentiels à la survie des bactéries et sont hautement conservés. Quatre antimicrobiens et leurs dérivés capables d'inhiber l'ARN polymérase bactérienne sont identifiés à partir des myxobactéries, à savoir la corallopyronine A, la myxopyronine A, la ripostatine A et la sorangicine A.

II-5-1-1 Myxopyronin :

Cet antibiotique est produit par *Myxobacterium Myxococcus fulvus* (Figure 09) (Irschik et al, 1983), Myxopyronin 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*. Elle a également une activité antibactérienne puissante contre quelques bactéries Gram-négatif, y compris *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* et *Francisella tularensis* (Benabad, 2017).

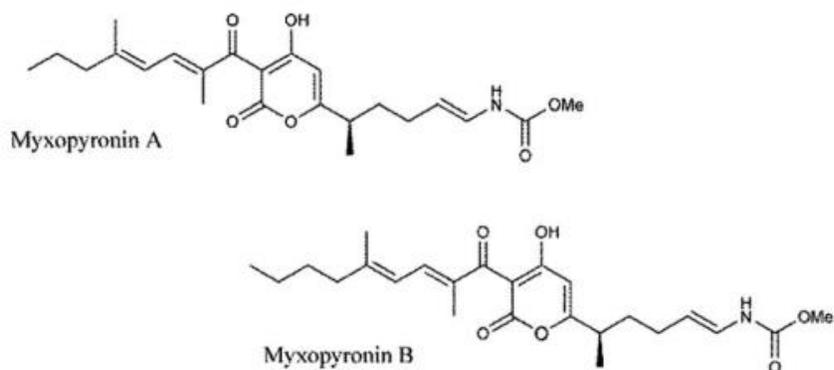


Figure 09 : La structure chimique de Myxopyronin A et B (Schäberle et al, 2014).

II-5-1-2 Corallopyronine :

Corallopyronine est un antibiotique possédant un groupement α pyrone (**Figure10**) produit par *myxobacterium Corallococcus coralloides*. Elle a été isolée pour la première fois en 1985. Il en existe trois formes : corallopyronine A, B et C. Elle est structurellement proche des myxopyronines, mais elle en diffère par la possession d'une extension de chaînes de sept carbones. (Irschik et al, 1985). . La corallopyronine est essentiellement active contre les bactéries à Gram positif avec des valeurs de CMI comprise entre 0.1 à 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et à forte concentration contre les bactéries à Gram négatif (CMI > 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) (Benabad, 2017).

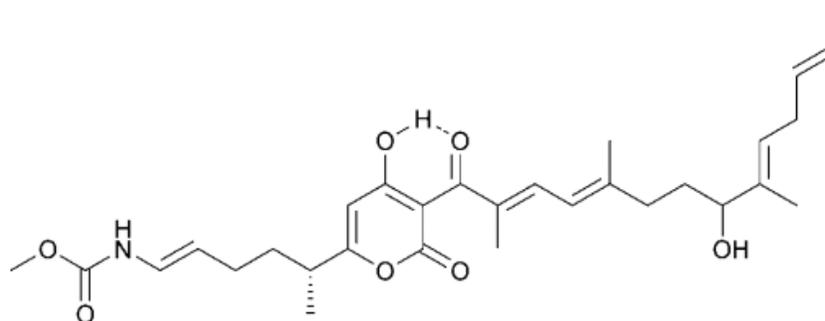


Figure 10 : La structure chimique de Corallopyronine (Weissman et Muller, 2010).

II-5-2 Inhibiteurs de la synthèse des protéines :

Certaines des molécules antimicrobiennes dérivées de la myxobactérie agissent en inhibant la synthèse des protéines dans les cellules cibles tel que : angiolam, althiomycine, myxovalgine.

II-5-2-1 Angiolam A :

L'Angiolam A est un antibiotique lactam-lactone (Figure 12) 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).

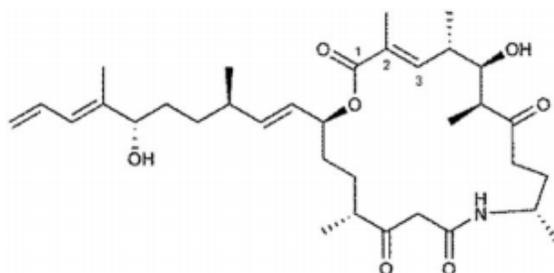


Figure 11 : La structure chimique d'Angiolam A (Schmitz et al, 2013).

II-5-2-2 Myxovalargine :

Les Myxovalargines A, B et C ont été obtenus de *Myxococcus fulvus* (Figure 13), 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).

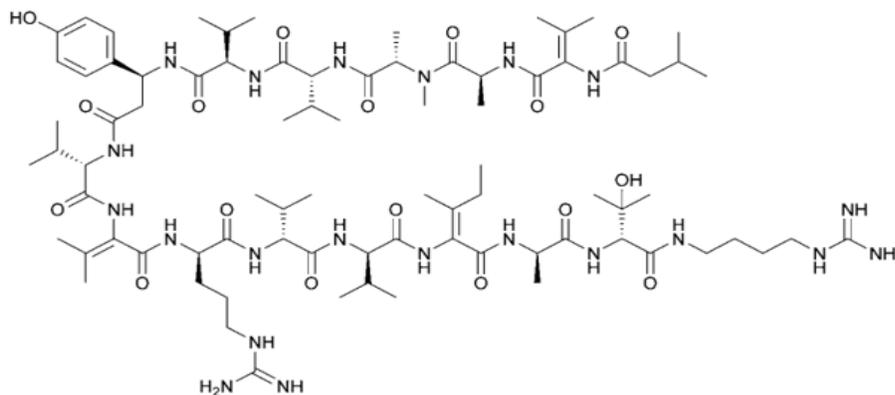


Figure 12 : La structure chimique de Myxovalargine A (Piel, 2010).

II-5-3 Inhibiteurs de la respiration :

Deux métabolites myxobactériennes actifs antibiotiques ont été trouvés qui cible la chaîne respiratoire : les aurachins et les thuggacins. Les enzymes de la chaîne respiratoire ne

représentent pas une cible dans l'antibiothérapie, puisque ces protéines sont très conservées dans tous les organismes. Par conséquent, le risque de toxicité est Haut.

II-5-3-1 Aurachins :

Les aurachins ont été isolés du myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. Les aurachins sont chimiquement des quinolones (**Figure 14**) (Oettmeier et al, 1990). Les quatre aurachines A, B, C et D décrites inhibaient les bactéries à Gram positif et quelques levures et moisissures. Ils ont bloqué l'oxydation du NADH. (Kunze et al, 1987).

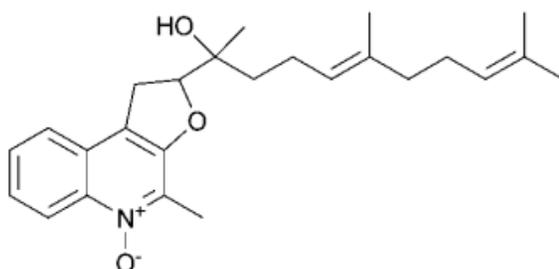


Figure 13 : La structure chimique d'aurachins (Weissman et Muller, 2010).

II-5-3-2 Thuggacine :

La thuggacine est un antibiotique qui appartient à la famille des macrolides (**Figure 11**), actif contre *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent causal de la tuberculose. Il a été isolé de la myxobactérie *Sorangium cellulosum* (Buntin et al, 2010).

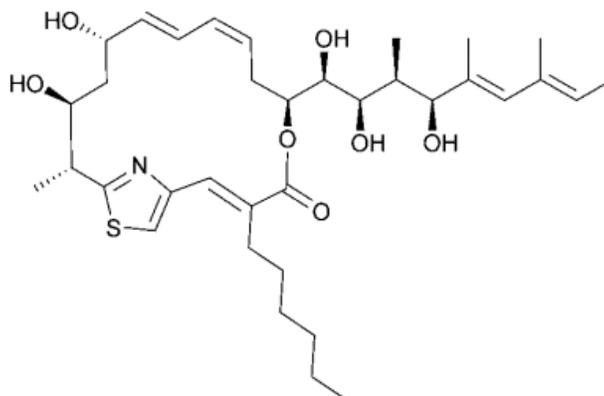


Figure 14 : La structure chimique de thuggacine (Schmitz et al, 2013).

II-5-4 Inhibiteurs de la formation de biofilms :

Les bactéries présentant sous forme de biofilm donnent une résistance élevée aux antibiotiques par rapport aux bactéries libres en raison de leur barrière imperméable à la pénétration d'antibiotiques.

II-5-4-1 Carolactone :

La Carolactone est un antibiotique qui appartient à la famille des macrolides (**Figure 15**), il a été isolé de *Sporangium cellulosum*. 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**).

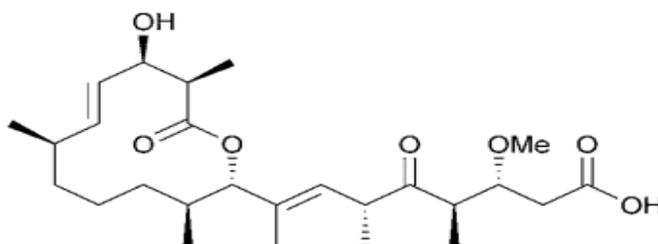


Figure 15 : La structure chimique de Carolactone (**Schmitz et al, 2013**).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

III-1 Objectif :

L'objectif principal de notre travail consiste à l'isolement sélectif des souches Myxobactériennes productrices des substances bioactives à partir de différents écosystèmes naturels de l'Algérie.

La réalisation de cet objectif nécessite :

- Isolement et confirmation de l'appartenance des souches au groupe des Myxobactéries.
- mise en évidence de l'activité antibactérienne chez les isolats obtenus.
- Sélection des isolats les plus performantes et production des métabolites bioactifs par fermentation sur le milieu CYB (Annexe).
- Extraction et caractérisation préliminaire de la molécule bioactive.

Ce travail a été réalisé aux laboratoires pédagogiques de l'université Dr. MOULAYTAHAR Saida, Faculté des sciences, Département de biologie, pendant la période allant de Janvier à mars 2020.

III-2 Zone d'échantillonnage :

Afin d'avoir une diversité d'isolats, les sites de prélèvements des échantillons sont réparties sur plusieurs régions dans le territoire nationale. 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 réaliser dans la wilaya de Saïda (Ain zerga, 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).

III-2-1 Collecte et traitement des échantillons :

Le sol utiliser pour l'isolement des myxobactéries doit être prélevé dans les quelques centimètres supérieurs du profil du sol. Les sols riches en organismes supérieurs et les échantillons prélevés entre les racines des plantes et près de la base des tiges donnent les meilleurs rendements. Si le matériau ne peut pas être traité peu de temps après la collection, il doit être séché à l'air aussi rapidement que possible car sinon l'échantillon pourrait devenir moisi, créant des problèmes plus tard pendant l'isolement. Quelques centimètres cubes de sol suffisent pour la plupart des techniques d'isolement. En général, il est préférable d'avoir plusieurs petits échantillons provenant de différentes localités qu'un seul grand lot à partir d'un point de détection (**Reichenbach et Dworkin, 1992**).

Lors de la prise échantillon ; Grattez le dessus du sol et enlevez pierres, mauvaises herbes et autres débris avant de procéder au prélèvement de terre ou substrat ; à l'aide d'un outil d'acier inoxydable ou de plastique, prélever au moins 15 prises en se déplaçant en zig-zag et en couvrant la surface de production. Il s'agit de prélever au moins 15 prises « carotte » de substrat et représentant en volume l'environnement racinaire de la culture. On doit éliminer les premiers centimètres de sol où généralement s'accumulent les sels et où les racines ne vont pas ; mélanger les prises dans un contenant de plastique propre et prélever environ 500 g (250 cm³) de sol humide pour l'expédition. Le contenant destiné à l'envoie doit être correctement fermé pour éviter tout déversement durant le transport.

Ces sols sont séchés 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.

III-3 Méthodes d'isolement

III-3-1 Isolement du sol par appâtage avec des granulés de fumier :

Avec les excréments, de meilleurs résultats sont généralement obtenus si les échantillons ne sont ni très frais ni très anciens.

Les excréments de lapin utilisés pour l'appâtage doivent être prélevés sur des animaux sauvages ; granulés de laboratoire ou de lapins domestiques sont généralement inadapté, peut-être parce qu'ils sont trempés d'urine dans la cage. Une grande boîte de Pétri est remplie de terre humidifiée avec de l'eau distillée jusqu'à sa capacité de rétention d'eau. Les granulés de fumier sont autoclavés et partiellement enfouis dans le sol environ la moitié des boulettes dépassant du sol. Après une semaine d'incubation à 30°C, des fructifications de myxobactéries, qui avaient migré sur les excréments du sol, observées au microscope (**Reichenbach et Dworkin, 1992**).

Dans chaque boîte, cinq boulettes de bouse de lapin autoclavé et séchées ont été incorporées (**Eied, 2013**).

La forme et les propriétés des colonies des isolats sont déterminées en décrivant les colonies individuelles à partir des dilutions en série sur des boîtes d'agar VY/2 (Annexe). Après une semaine d'incubation de sol avec le fumier de lapin, on termine l'isolement par une série de dilution à partir d'une solution mère : 1g d'échantillon : (sol avec fumier de lapin) dans 9 ml TSE (Annexe) jusqu'à dilution 10^{-6} sur le milieu VY/2 puis incuber à 30°C pendant 48h (**Eied, 2013**).

III-3-2 Méthode d'isolement à l'aide des séquences d'*E.coli* :

Après autoclavage de milieu (WCX) (Annexe), l'ajout de l'antifongique cycloheximide (25 μg / 100 ml de l'eau distillé stérile) est nécessaire pour limiter le développement de champignons. Le milieu est ensuite répartis en boîtes de Pétri.

E. coli est cultivée dans 10ml de bouillon Luria (Annexe). Après ; incubation à 37°C pendant 24 heures, la culture est centrifugé a une vitesse de 10000 tour pendant 10 min. Puisensemencée le culot obtenu est encemencé en croix (+) à la surface de la gélose au cycloheximide (WCX). Le centre de la croix est ensuite inoculé avec une quantité de sol de taille d'un pois. Les boîtes de Pétri

sont incubées à 30°C et examinées pour observer l'essaim, les colonies et les fructifications après 1–4 semaines d'incubation (Eied ,2013).

III-3-3 Isolement du sol par appâtage à l'aide des stries *Escherichia coli* :

Après autoclavage de milieu (WCX). L'antifongique cycloheximide (25 μg / 100 ml de l'eau distillé stérile) est ajouté pour limiter le développement de champignons, le milieu est ensuite répartis en boîtes de Pétri.

E. coli vivante est ensemencée en croix sur la surface de la gélose au cycloheximide (WCX) (Annexe).Le centre de la croix a été inoculé avec une quantité de sol de taille d'un pois qui est imbibé par l'eau distillé stérile (**figure 16**). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30° C et examinées pour l'essaim, les colonies et les fructifications après 1–4 semaines d'incubation (**Zhang et al, 2013**).

III-3-4 Isolement des myxobactéries à l'aide de papier filtre :

Une quantité de sol de taille d'un pois est placée sur un morceau de papier Whatman n°1 de 1 cm² sur un milieu gélose ST21CX (un mélange de solution A et solution B) (Annexe).Ces solutions ont été passées à l'autoclave séparément. Les solutions A et B sont combinées puis complétées avec 25 μg / ml de cycloheximide. Ce milieu est appelé ST21CX (Annexe). Les échantillons dans les milieux ST21CX ont été incubés à 30°C pendant 2 à 4 semaines (**Meliah et Lisdiyanti, 2018**) (**Figure 16**).

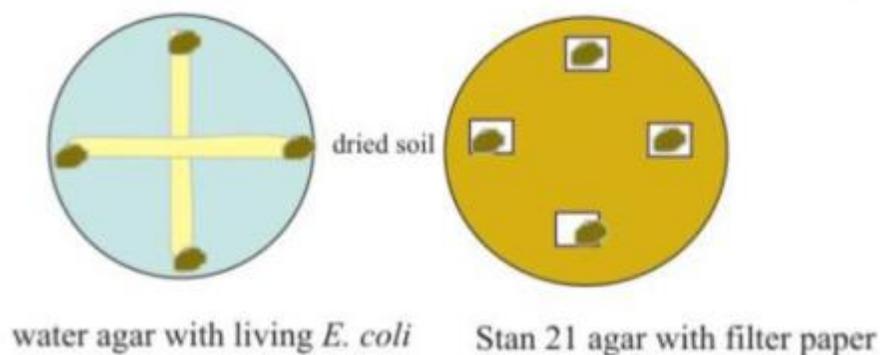


Figure 16 : Procédure d'isolement commune pour les myxobactéries (**Mazaikina, 2016**).

III-4 Purification des isolats de myxobactéries :

Purification directe à partir d'essais ou de fructifications :

La reconnaissance des myxobactéries est réalisée par la morphologie des colonies et des fructifications selon les critères décrits par Reichenbach et Dworkin , (1992).

Al'aide d'une aiguille stérile les colonies et les fructifications sont transférés sur des boites de pétri contenant la gélose CY (Annexe) par dépôt (Eied, 2013).

Le processus de transfert est mené plusieurs fois jusqu'à ce que les cultures pures des myxobactéries sont obtenues (Meliah et Lisdiyanti, 2018).

III-5 Vérification de la pureté des souches :

Les isolats myxobactériennes obtenus sont observés morphologiquement à l'aide d'une loupe et des microscopes binoculaires. Plusieurs caractères sont observés (Meliah et Lisdiyanti, 2018).

III-5-1 Macromorphologie et caractères cultureux :

Il comprend les corps de fructification qui émergent des jours après l'incubation dans les milieux de culture CY, VY/2 ainsi que le modèle et la couleur des colonies d'essai. Les corps fruités ont été écrasés pour examiner les myxospores (Meliah et Lisdiyanti, 2018).

Les couleurs des corps fruités varient de laiteux, jaune, orange, rouge, brun et même noir. L'isolat dégradant de papier cellulosique apparut sous formes des taches de différents couleurs généralement noirs et orange. Pour les isolats avec *E.coli* sont apparus sous forme des zones claires autour des zones de croissance myxobactériennes. Les colonies sont très étales, ressemblant à une gelée sur l'agar (Mohr, 2018).

III-5-2 Micromorphologie :

Les myxobactéries sont des cellules végétatives en forme de bâtonnets et créent des myxospores enfermées dans une paroi cellulaire visqueuse (Nadmid, 2015). Elles se caractérisent par le fait qu'elles n'ont pas de système de locomotion : ni flagelle, ni cils (Reichenbach et Dworkin, 1992).

➤ **Réalisation d'un frottis coloré et observation au faible grossissement :**

Déposer sur une lame propre une goutte d'eau distillée stérile lorsque la culture prélevée est solide, puis prélever à l'aide de l'anse de platine une parcelle de la culture. Mélanger afin d'obtenir une suspension homogène.

Réaliser le frottis en partant du centre de la lame, on décrivant avec l'anse des mouvements circulaires de façon à obtenir un étalement mince et homogène sur au moins 2/3 de la lame. Stériliser l'anse.

Sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme du bec Bunsen sans trop le chauffer. La technique la plus sûre consiste à passer dans la flamme le frottis 3 ou 4 fois une demi-seconde, sans passer la bactérie vers la flamme. Le frottis étant fixé. Et observée sous microscope optique (G×40). Ensuite réaliser la coloration de Gram (**Camille, 2007**).

➤ **Observation au fort grossissement :**

Est une observation au microscope optique (G×100), après coloration de Gram (Annexe). La coloration de Gram est une double coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme (**Camille, 2007**).

III-6 Méthodes de conservation :

Les colonies myxobactériennes obtenues sur le milieu CY, pures, numérotées, sont conservées selon différentes méthodes :

- Conservation en gélose inclinée à 4 °c après incubation de 3 jours à 30°C, un repiquage est effectué tous les 15 jours (**Eied, 2013**).
- A la congélation à -20 °C après une culture liquide sur le milieu CY, et en présence du glycérol (15 %) utilisé comme cryo-protecteur pour une durée plus longue : (Les tubes à essai contenant 2/3 de milieu CY liquide avec 1/3 de glycérol à 15 %) (**Eied, 2013**).
- A -80 °C après une culture liquide et en présence du glycérol (10 %) complétée par le CaCl₂.2HO de 0,1 % (**Meliah et Lisdiyanti, 2018**).

- Pour un stockage à long terme, la congélation dans l'azote liquide est la méthode de choix. Ajouter 5% de sulfoxyde de diméthyle (DMSO) au milieu de suspension. Remplir des quantités de 0,5 ml de la suspension dans des ampoules de verre, les sceller, et les plonger dans l'azote liquide. Le DMSO peut ne pas être nécessaire puisque toutes les cellules stockées sans DMSO ont survécu, jusqu'à présent pendant 2 ans (**Reichenbach et Dworkin, 1992**).
- Une excellente méthode pratique pour la préservation des myxobactéries est la congélation à - 80°C. Des échantillons de 1 ml sont transférés de cultures liquides en croissance exponentielle à des tubes à vis et placés directement dans le gel profond. Alternativement, les bactéries peuvent être grattées de la surface d'une jeune culture d'agar, transférées à un milieu de CAS de 1 ml et congelées. Pour cette méthode de préservation nombreuses myxobactéries ont survécu dans la congélation profonde pendant 8 à 10 ans (**Reichenbach et Dworkin, 1992**).

III-7 Recherche de l'activité antibactérienne :

III-7-1 Souches bactériennes tests :

L'activité antibactérienne des myxobactéries isolés est recherchée contre 5 souches bactériennes indicatrices (**Tableau 03**) : deux bactéries à Gram positifs : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778). Et trois bactéries à Gram négatifs : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Salmonella Montevideo* (ATCC 3581).

Tableau 03 : Caractéristiques des souches testées.

Espèce	Caractéristiques des souches indicatrices.	Manifestations cliniques.
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778) (Figure 17).	Bacille à Gram positif, Mobile par ciliature péritriche, Colonies sur gélose sérum Rugueuses (absence de capsule), Endospore ovale non déformante, Oxydase (+), Hémolyse (+++), Lécithinase (+++), Glucose (+), Mannitol (+) Xylose (-), Pénicilline G résistant. (Avril et al, 1992).	- Les infections digestives : Syndrome diarrhéique. - les infections locales : Ostéomyélites. - les infections systémiques : Septicémies (Teyssou et al, 1998).
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) (Figure 18).	Cocci, Gram positif, groupe en amas (forme grappe de raisin), aéroanaérobie facultatifs, sporulé, non capsulé, immobile, catalase (+), oxydase (-) (Williams et Wilkins, 1993).	- L'ingestion d'entérotoxine préformées dans l'aliment : Abscess, vomissements, diarrhées, hypotension, déshydratation. (Williams et Wilkins, 1993).
<i>Salmonella montevideo</i> (ATCC 3581). (Figure 19).	Bacilles à Gram négatif, mobiles, produisant du gaz en glucose, lactose (-), ONPG (-), possédant une LDC et une ODC, utilisant le citrate de simmons comme seule source de carbone, ne possédant ni uréase, ni TDA, ni gélatinase, ne fermentant pas le saccharose, le raffinose et la	- Maladies chez les poulets (Lalsiamthara et Lee, 2017). - Formes septicémiques : les fièvres. - Les salmonelloses purement digestives, les toxi-infections alimentaires : diarrhées, fièvre, vomissements.

	salicine, (VP) Voges-Proskauer (-) (Avril et al, 1992).	- Les formes extra-digestives : infections urinaires. (Avril et al, 1992).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) (Figure 20).	Bacilles pyocyanique fins droites, Gram négatif, aérobic stricte, colonies muqueuses, Adhésion par des pilis polaires et très mobiles grâce à un <u>flagelle</u> polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles. pourvue d'une odeur de seringa, oxydase (+), <u>gélatinase</u> (+), Lactose (-) (Williams et Wilkins., 1993).	responsable d'infection nosocomiales , infection de l'œil, des plaies, des urines, gastro-intestinales et des poumons, des méningites d'inoculation, des septicémies, des infections systémiques chez les immunodéprimés , fibrose kystique (mucoviscidose). (Williams et Wilkins., 1993).
<i>Escherichia coli</i> (ATTC 25922) (Figure 21).	Bacille, Gram (+), mobile, aéroanaérobic facultatifs, parfois capsulé, capable de fermenter le lactose et produire de l'indole. (Denis et al, 2007).	- Gastro-entérite, diarrhée. - Infections urinaires. - Méningites, septicémie. (Denis et al, 2007).

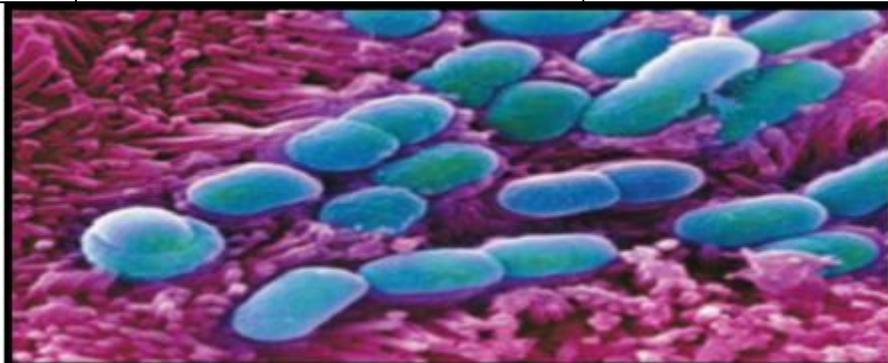


Figure 17 : *Escherichia coli* vue au microscope électronique et coloré artificiellement **(Camille, 2007).**

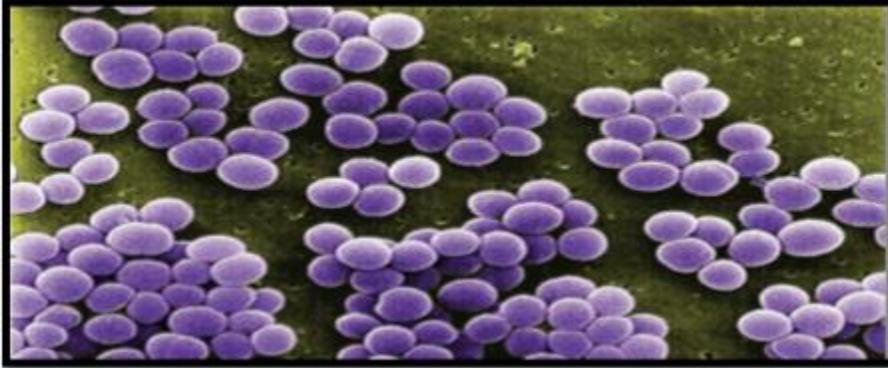


Figure 18 : *Staphylococcus aureus* vue au microscope électronique et coloré artificiellement (Camille, 2007).



Figure 19 : *pseudomonas aeruginosa* vue au microscope électronique et coloré artificiellement (Camille, 2007).



Figure 20 : *Salmonella montevideo* vue au microscope électronique et coloré artificiellement (Camille, 2007).



Figure 21 : *Bacillus cereus* vue au microscope électronique et coloré artificiellement (Camille, 2007).

III-7-1-1 Revivification des bactéries testent :

Avant la réalisation des tests antibactériens, deux repiquages consécutifs sont effectués pour chaque souche. En premier lieu, elles sont inoculées dans le BN (Annexe).et incubées pendant 24 h à 37°C. Le deuxième repiquage est effectué sur milieu solide (Gélose nutritive) la veille de la réalisation du test antibactérien. L'ensemble sont incubés à 37 °C pendant 18 h pour avoir des cellules bactériennes à leur phase exponentielle de croissance (Boubric et Boussad, 2007).

➤ Vérification de la pureté des souches :

La pureté des souches cibles est vérifiée par observation microscopique à l'objectif 100 après coloration de Gram.

➤ Préparation des inocula des bactéries-tests

Des suspensions bactériennes sont préparées à partir des cultures de 18 h. La densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par dilution dans l'eau physiologique stérile, et par rapport à la solution Mc Farland 0,5 (densité optique égale à 0,2 à 650 nm) afin d'obtenir une concentration finale de 10^6 CFU/ml (Bramki et al, 2017).

III-7-2 Criblage des myxobactéries pour déterminer leur activité antibiotique

III-7-2-1 Méthode de Fleming :

Les myxobactéries sont cultivées sur la gélose de CYB à 30 °C pour donner des colonies de 2 cm. Les boîtes sont ensuite recouvertes de 5 ml de milieu Mueller Hinton molle (Annexe) contenant 10⁶ cellules / ml d'organisme d'essai (souches indicatrices) (Foster et al, 1992). Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 18h à 24h, les résultats sont appariés sous forme des zones d'inhibition autour des colonies de Myxobactéries (Bramki et al, 2017).

III-7-2-2 Technique des cylindres d'agar :

Dans cette méthode les isolats de myxobactéries sont ensemencés en stries serrées à la surface de gélose VY/2. Après une période d'incubation de 7 jours à 30 °C, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce stérile et déposés à la surface du milieu Mueller Hinton (Annexe) préalablement ensemencé par 10⁶ cellules / ml des bactéries cibles : *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. montevideo* (Eied, 2013).

Les boîtes pétri portant les cylindres d'agar sont pré incubés à 4°C pendant 4h afin de permettre la prédiffusion des substances antibactérienne (Ouargli,2018). Une incubation à 37°C pendant 18h à 24h est ensuite réalisée. Les résultats se manifestent sous forme des zones claires d'inhibition aux alentours des cylindres d'agar (Bramki et al, 2017).

III-8 Extraction des métabolites secondaires

III-8-1 Extraction des métabolites secondaires de fermentation sur milieu liquide

➤ Extraction d'antibiotiques issus de cultures liquides

Les myxobactéries sont inoculées dans un milieu 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) (Foster et al, 1992).

III-8-2 Test pour l'activité antibiotique

Des échantillons de 50 ul d'extrait brut sont appliqués sur des disques stériles de 6 mm de diamètre de papier filtre Whatman No 1. Lorsque le chloroforme avait s'est évaporé, les disques sont placés à la surface des boîtes de MH ensemencés avec 10^7 cellules/ml de bactéries d'essai. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 2-4 jours et examinées pour la présence de zones d'inhibition. Un témoin est réalisé par la même technique en utilisant un disque contenant 50 ul de chloroforme seulement (Foster et al, 1992).

III-8-1 Analyse de la production des métabolites secondaire

Un certain nombre d'essais sont effectués avec les extraits bruts, dont le but était de trouver et d'identifier éventuellement de nouveaux produits naturels avec une activité antimicrobienne, L'analyse des extraits bruts consistait en des tests de dilution en série dans plaques de 96 puits contre différents organismes d'essai bactériens (Mandelshtam, 2016).

III-8-2 Test de dilution en série

III-8-2-1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice sur microplaque

Afin de vérifier les extraits bruts pour la présence de métabolites d'effet antibiotiques, des tests de dilution en série (SDT) sont effectués. Le principe de l'essai est basé sur l'exécution d'une série de dilutions de l'extrait brut avec la culture bactérienne de différents organismes d'essai. Si le SDT est effectué avec une substance pure de concentration connue, par exemple 1mg/ml, une valeur de concentration minimale d'inhibitrice (MIC) peut être déterminé. Cette valeur indique la concentration minimale d'un composé bioactif, à laquelle aucune croissance microbienne n'est visible à l'œil nu. Ou mesurable avec un lecteur de plaque. Étant donné que ni la composition quantitative ni qualitative des extraits n'est connue, aucune valeur MIC ne peut être déterminée. Cependant, l'essai de dilution en série effectué avec des extraits bruts montre, si les métabolites microbiens contenus inhibent les organismes d'essai choisis.

III-8-2-2 Préparation de l'inoculum bactérienne :

En tant qu'organismes d'essai, les bactéries Gram négatives et Gram-positives sont choisies. Tout d'abord, des aliquotes de culture bactérienne, prélevés dans le stockage cryogénique à -80 °C, ont été utilisés pour l'inoculation de Müller-Hinton liquide par les bactéries d'essai en conséquence. Environ 20 ml de supports ont dû être inoculés avec le train d'essai pour préparer suffisamment de culture pour une plaque de puits de 96. La quantité d'aliquote, utilisée pour l'inoculation, variait d'un organisme d'essai à l'autre. La quantité exacte pour chaque souche était basée sur la densité initiale requise de la culture, qui, compte tenu du taux de croissance individuel d'un micro-organisme, conduirait en 24 heures à une croissance distincte dans les puits. Ces montants ont été fixés par la procédure standard du groupe MSC.

III-8-2-3 Préparation et inoculation de la microplaque :

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 du 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.

En conséquence, la plaque avait 8 concentrations différentes de chacun des 11 extraits bruts et du méthanol (**Figure 22**). La concentration de l'extrait dans la rangée inférieure était toujours la moitié de la concentration dans la rangée supérieure.

Lorsque des plaques pour chaque organisme testé ont été préparées, elles ont été incubées sur le shaker vibrant Titramax 1000 (Heidolph Instruments GmbH) à 160 tr/min. Les organismes d'essai ont été incubés à 37 °C.

Après 24 heures, l'inhibition de la croissance a été vérifiée. La concentration relative de l'extrait brut a été considérée comme inhibant, si aucun signe de croissance n'était présent dans le puits correspondant. La ligne inhibée avec la plus faible concentration relative d'un extrait a été notée pour le micro-organisme donné (**Mandelshtam, 2016**).

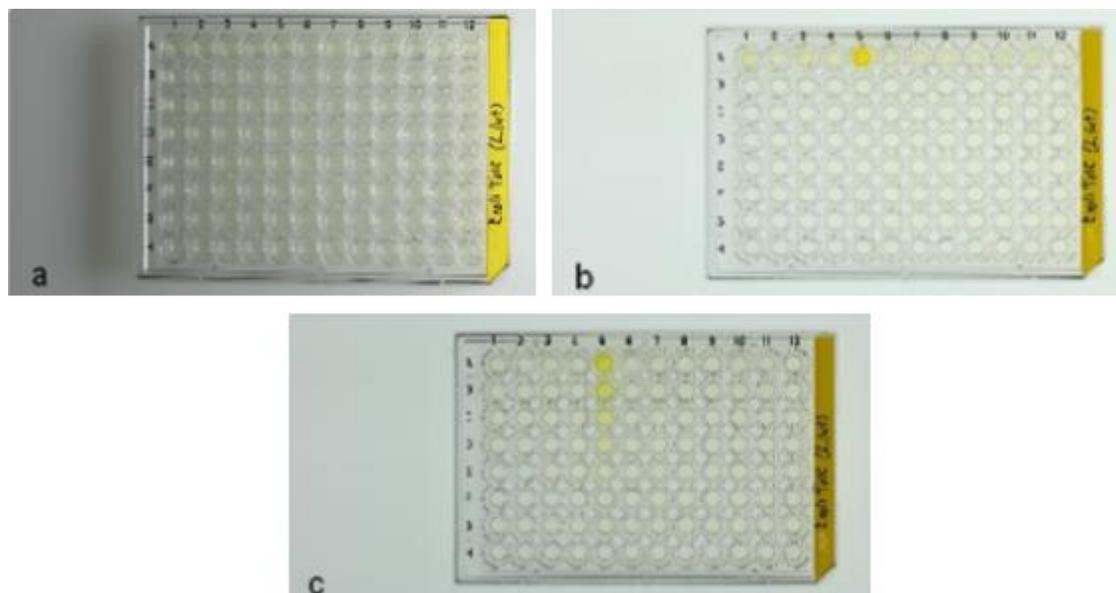


Figure 22 : Plaque de biotest, remplie d'a) culture microbienne d'un organisme d'essai, b) en plus des extraits testés dans la première rangée, c) avec extraits, dilué de haut en bas (**Mandelshtam, 2016**).

Résultats et Discussion

IV-1 Isolement des myxobactéries :

A partir de 9 échantillons de sol collectés sur les différentes régions, 13 isolats de myxobactéries sont obtenus à partir des sols de : Aïn Temouchent, Ouargla, Sebkhia de Bougtoub, Sédiment de mère de Sablet et de la Salamandre (Mostaganem). Les isolats sont obtenus suite à un isolement par la méthode de l'appâtage avec des granulés de fumier du lapin (tableau).

IV-1-1 Isolement des myxobactéries cellulolytique :

Après 3 semaines d'incubation à 30°C sur le milieu ST21CX. Un changement de couleur de papier est observé il devient de couleur jaune orange avec la présence des taches noires résultant à la dégradation de la cellulose par les isolats myxobactériennes .des résultats positifs (**Tableau 04**), sont obtenue sur les échantillons de sol : Bechar, Aïn zerga : (Saïda) et sédiment de mère de Sablet (**Figure 23**). Alors qu'aucune modification sur la forme et/ou la couleur du papier n'est observé sur les autres échantillons.

Tableau 04 : L'origine des isolats myxobactériennes cellulolytique des 9 échantillons.

Sites d'échantillonnages	Sablet	Salamandre	Bechar	Aïn zerga	Bougtob	Ouargla	Aïn Temouchent	Moulay Larbi	Daoud
Myxobactéries cellulolytique	+	-	+	+	-	-	-	-	-

(+) : Changement de couleur de papier filtre et la présence des taches.

(-) : Aucun changement.

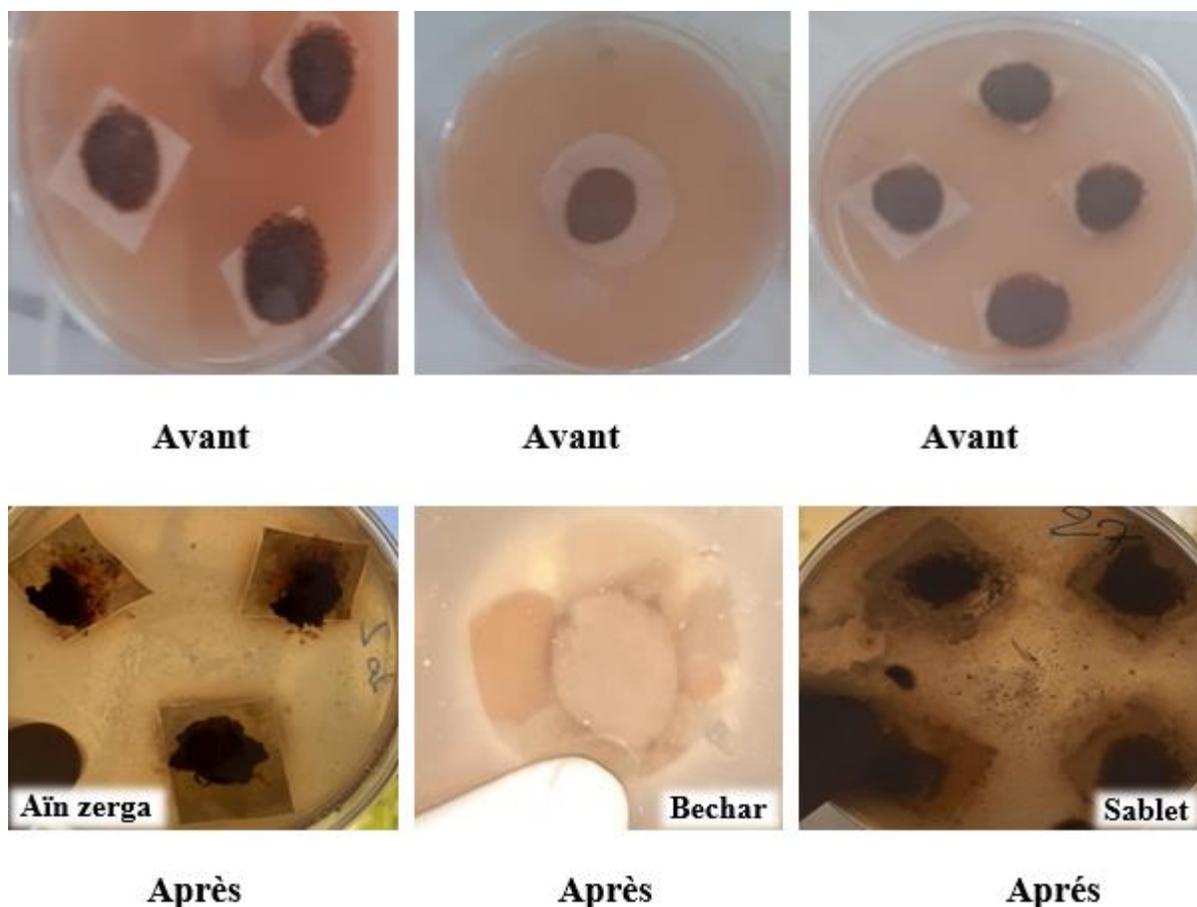


Figure 23 : les isolats mycobactériennes dégradant la cellulose sur le milieu Stan21CX.

IV-1-2 Isolement des Mycobactéries bactériolytiques :

Après 3 semaines d'incubation à 30°C de nos échantillons sur le milieu WCX. La lyse des cellules *E. coli* vivantes par les isolats mycobactériennes est indiquée par l'apparition des zones claires autour des zones de croissance mycobactériennes dans les échantillons de sol (**Tableau 05**) : Sebka de Bougtoub, sédiment de mère de Sablet et de Salamandre (**Figure 24**). Pour la deuxième méthode où on a utilisé le culot de la culture d'*E. coli*, aucun résultat positif n'est obtenu. Ceci est dû peut être au taux d'humidité faible des sols utilisés surtout que les mycobactéries nécessitent une longue durée d'incubation provoquant un dessèchement du milieu de culture.

Tableau 05 : L'origine des isolats myxobactériennes à l'aide des séquences d'*E.coli* vivante des 9 échantillons.

Sites d'échantillonnages	Sablet	Salamandre	Bechar	Aïn zerga	Bougtob	Ouargla	Aïn Temouchent	Moulay Larbi	Daoud
Myxobactéries bactériolytique avec <i>E. coli</i> vivante	+	+	-	-	+	-	-	-	-

(+) : Apparition des zones claire autour des zones de croissance myxobactériennes.

(-) : Absence des zones claire autour des zones de croissance myxobactériennes.

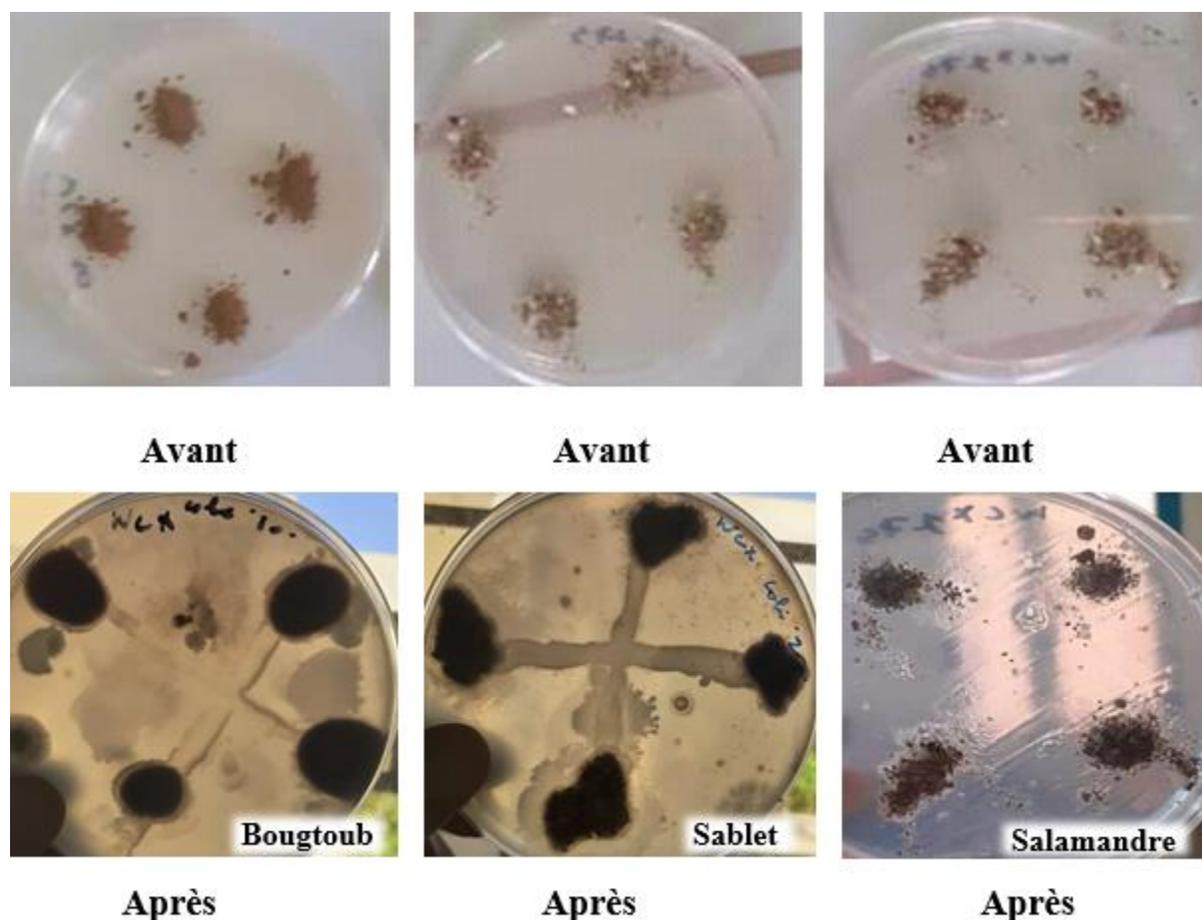


Figure 24 : l'isolement des mycobactéries à l'aide des séquences d'*E.coli* vivante sur le milieu WCX.

IV-1-3 Isolement par appâtage avec des granulés de fumier de lapin

Après une semaine d'incubation à 30°C, il y'a une apparition des corps fruitiers de forme sphérique de couleur blanche à la surface de granules de fumier de lapin (**figure 25**) dans les échantillons de sol : Ain Temouchent, Aïn zerga et Daoud (Saïda), Sebkhha de Bougtoub, Ouargla, Bechar et Sédiment de mère de Sablet et de la Salamandre :(Mostaganem), Alors qu'aucune croissance n'est observé dans les reste des échantillons (**Tableau 06**).

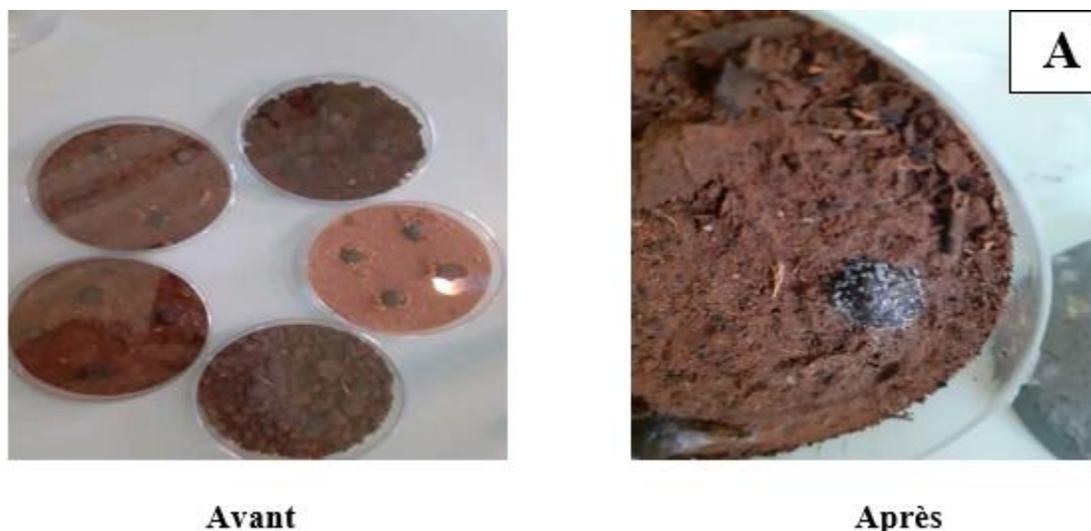


Figure 25 : Isolement du sol par appâtage avec des granulés de fumier.

A) : les corps fruitiers myxobactériennes dans le sol de plante (Sidra ; Daoud).

IV-2 Purification des isolats de myxobactéries :

Selon les critères décrits par **Reichenbach et Dworkin, (1992)**. La reconnaissance des myxobactéries est réalisée par la morphologie des colonies.

Les isolats myxobactériennes obtenues sur le milieu VY/2 sont ensuite purifiés par le processus de transfert des colonies plusieurs fois sur le milieu CY jusqu'à ce que les cultures pures des myxobactéries sont obtenues (**Meliah et Lisdiyanti, 2018**). Les 13 souches de myxobactéries isolées par méthode d'appâtage avec les granulés de fumier sont regroupées dans le (**Tableau 05**).

Tableau 06 : L'origine des souches myxobactériennes isolées par méthode d'appâtage avec les granulés de fumier sur le milieu CY.

Code des souches	Origine	Photos
Myx1	Aïn Temouchent	
Myx2	Mostaganem « Sédiment de mère de Sablet »	
Myx3	Mostaganem « Sédiment de mère de Sablet »	
Myx4	Ouargla	
Myx5	Aïn Temouchent	
Myx6	Aïn Temouchent	
Myx7	Aïn Temouchent	

Myx8	Sebkha de Bougtoub	
Myx9	Mostaganem « Sédiment de mère de Sablet »	
Myx10	Aïn Temouchent	
Myx11	Aïn Temouchent	
MyxA	Mostaganem « Sédiment de mère de de Salamandre »	
Myx2.5	Mostaganem « sédiment de mère de Sablet »	

Les sols de Ain Temouchent, Aïn zerga : (Saïda), Sebkha de Bougtoub, Ouargla et Bechar et Sédiment de mère de Sablet et de la Salamandre :(Mostaganem) utilisé dans ce travail offrent le plus grand nombres des myxobactéries. Parmi ces isolats il y' a des myxobactéries cellulolytique isolés des sols de Bechar, Aïn zerga, et du Sédiment de mère de Sablet et de la Salamandre. Et des myxobactéries bactériolytique sont isolés à partir des sols de sebkha de bougtoub, Sédiment de mère de Sablet et de la Salamandre.

Le nombre d'isolat réduit (13) par rapport au nombre des échantillons utilisé est du probablement à la contamination .cette influence des contaminations sur la croissance des myxobactéries est du probablement à la vitesse de croissances de ces derniers par rapport aux autre groupes bactériennes. Pour cela on suggère que l'utilisation d'un antibiotique ou antibactérienne qu'agisse principalement contre les grams (+) peut réduire l'influence de ce phénomène.

De plus, la purification des myxobactéries est un vrai problème, car il produit une feuille de boue dure dans laquelle les contaminants protéger ou croître si lentement que les contaminants ont amplement le temps de se multiplier et de se propager à travers la colonie d'essaims myxobactériennes (Reichenbach, 1983).

La présence des plaques de lyse pendant le développement de la souche Myx09 et les souches de première purification de sol de Sedra ont été observés sur les boites de pétris de milieu CY (**Figure 26**) qui contient la caséine comme composé principale à la croissance et la sélection des myxobactéries. Selon **Petit et Guespin, (1992)** c'est une activité lytique (Enzymatique) dû probablement à l'utilisation et la dégradation de la caséine (activité protéolytique).

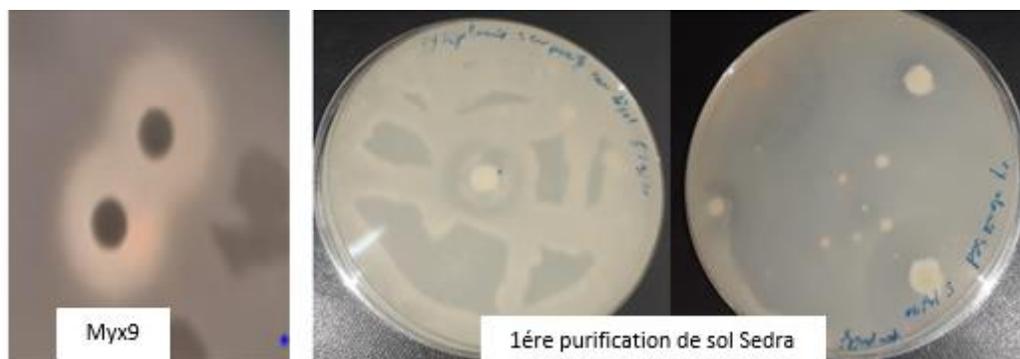


Figure 26 : activité protéolytique sécrétée par Myx9 et les souches purifiées de sol Sedra.

Dans la méthode d'isolement du sol par appâtage avec des granulés de fumier de lapin ; il y a une absence des corps fruitiers pour la majorité des granulés de fumier, pour un meilleur résultat doivent être prélevés des granulés de fumier à partir des animaux sauvages ; les granulés de lapins de laboratoire ou domestiques ne conviennent généralement pas, peut-être parce qu'ils sont imbibés d'urine (**Reichenbach et Dworkin, 1992**).

IV-3 Caractéristiques macroscopiques des isolats :

Les résultats de l'examen macroscopique des isolats sur le milieu CY sont représentés dans le (Tableau 07) :

Tableau 07 : Aspect macroscopique et caractères cultureux des trois isolats sélectionnés.

Isolats myxobactérienne	Taille	forme	Couleur	Aspect
Myx2.5	Grande	Irrégulier, bossue	Blanche	rugueux, visqueuse
MyxA	Grande	Irrégulier, Semi bombé	Beige Clair	lisse, brillante
Myx10	Grande	Irrégulier, Semi bombé	Blanche	rugueux, visqueuse

D'après le **tableau 07** les 3 isolats myxobactériennes obtenues sont d'une taille grande avec une forme irrégulière semi bombé pour MyxA et Myx10 et irrégulier bossue pour Myx2.5.

Les isolats Myx2.5 et Myx10 sont de couleur blanche avec un aspect rugueux et visqueuse alors que l'isolat MyxA a une couleur Beige Clair avec un aspect lisse et brillante.

IV-4 Caractéristiques microscopiques des isolats :

L'observation microscopique Gx100 à l'immersion confirme que toutes les souches sont Gram négatif (**Figure 27**) et se présentent sous forme de bacille et coccobacille.

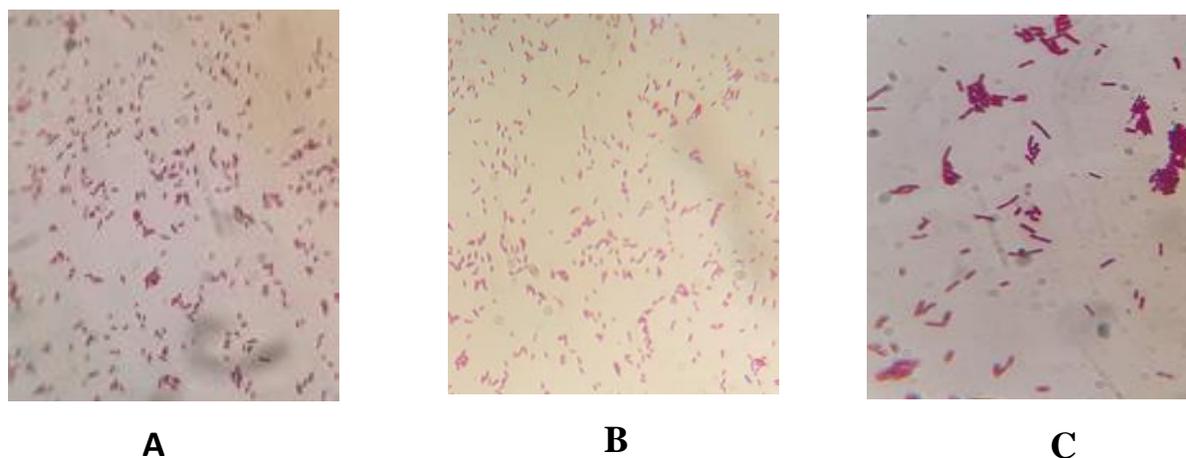


Figure 27 : Observations microscopiques des trois myxobactéries sélectionnés après une coloration de Gram avec un grossissement (G : x100) **A** : Myx2.5, **B** : MyxA, **C** : Myx10

D'après la figure l'isolat Myx2.5 se présente sous forme de bacille long, mince et incurvé et les cellules sont dispersées donc pas de mode de regroupement spécifique. Pour l'isolat MyxA se présente sous forme de coccobacille et les cellules sont dispersées alors que l'isolat Myx10 est une Bacille longue sous forme unique .Avec des bords circulaire non pointés. Et/ou de regroupement irrégulier.

IV-5 Réaction de catalase et oxydase :

Les résultats des tests catalase et oxydase des trois isolats sont rassemblés dans le (**Tableau 08**) ci-dessous.

Tableau 08 : caractéristiques biochimiques des trois isolats myxobactériennes.

	Myx2.5	MyxA	Myx10
Test de catalase	-	+	+
Test d'oxydase	+	+	+

➤ **Recherche de Catalase :**

Le test de catalase, montre que deux isolats : MyxA, Myx10 sont de catalase positive (apparition de bulles d'air) (**Figure 28**) alors que la souche Myx2.5 est de catalase négative (Pas de bulles d'air). D'après **Tortora et al,(2003)**, la catalase c'est une enzyme oxydoréductase qui catalyse la peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène



Figure 28 : Résultats de test de catalase pour identifier les deux isolats : MyxA et Myx10.

➤ **Recherche d'oxydase :**

L'examen de la recherche de l'oxydase, montre que les trois souches sont d'oxydase positive (apparition d'une tache violette) (**Figure 29**). D'après **Harold, (1992)** L'oxydase c'est une enzyme intervenant dans divers couples d'oxydo-réduction. La recherche de la phénylène-diamine-oxydase qui agissant sur un substrat incolore, entraîne la formation d'une semiquinone rouge. Cette dernière très instable, s'oxyde rapidement en donnant un composé noirâtre. Ce tests sont à la base de l'identification des bactéries Gram (-).

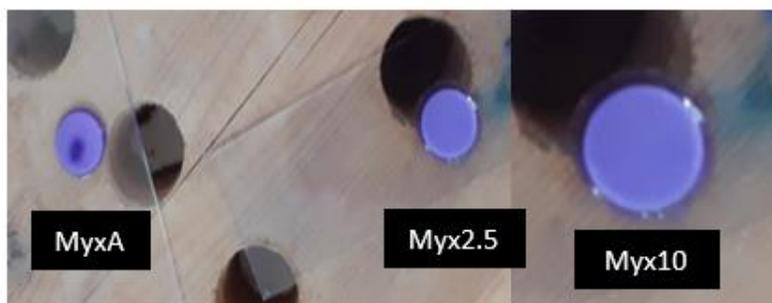


Figure 29 : Résultats de test oxydase pour identifier les isolats : MyxA, Myx2.5, Myx10.

IV-6 Activité antibactérienne :

L'évaluation du pouvoir antagoniste de trois isolats myxobactériennes retenus est étudié vis-à-vis des cinq bactéries indicatrices (**Annexe 1 et 2**), à savoir ; deux bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778). Et trois bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Salmonella Montevideo* (ATCC 3581). Par deux méthodes directes (méthode de Fleming et méthode de cylindre d'agar).

IV-6 -1 Technique de Fleming :

Les résultats de l'activité antibactérienne obtenus par cette technique vis-à-vis des cinq souches bactériennes tests sont reportées dans le (**Tableau 09**) et la (**Figure 30**). L'inhibition se traduit par la formation d'une zone claire autour l'isolat déposée avec des bordures bien distinctes. (**Figure 31**).

Tableau 09 : Résultat de l'activité antibactérienne des trois isolats contre les cinq souches indicatrices déterminées par la méthode de Fleming.

Les isolats myxobactériennes	Diamètre des zones d'inhibition (mm)				
	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.monteridea</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>
Myx A	0	0	0	0	0
Myx 10	0	0	0	0	0
Myx 2.5	33	22	34	0	26

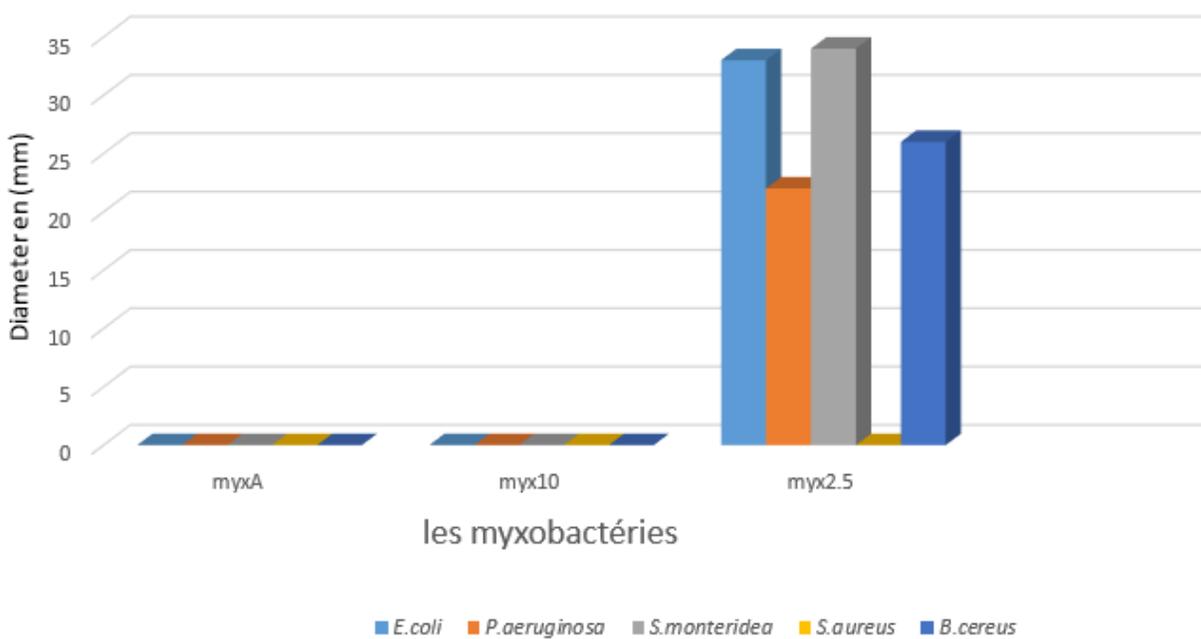


Figure 30 : Un diagramme représente le diamètre des zones d’inhibition des trois isolats contre les cinq souches pathogènes tests (Technique de Fleming).

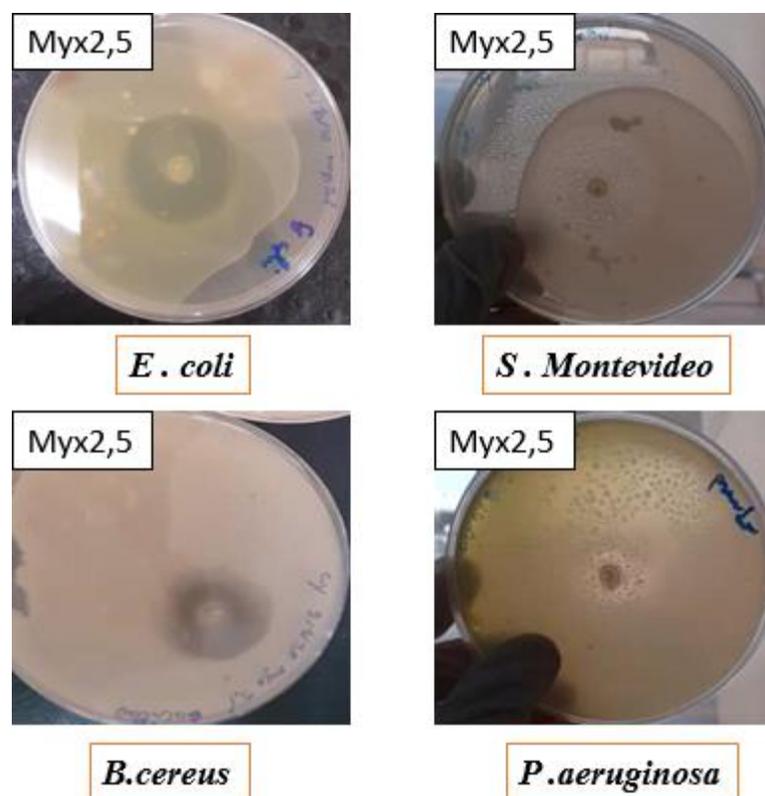


Figure 31 : la zone inhibitrice de l'isolat Myx2.5 contre les souches pathogènes tests (Technique de Fleming).

Les résultats obtenus par la méthode de Fleming présentent un spectre d'activité antibactérienne important pour l'isolat Myx 2.5 contre toutes les souches testées à l'exception de *Staphylococcus aureus* ou aucune activité n'est observée. Les plus grandes zones d'inhibition sont obtenues contre les deux bactéries à Gram négatif : *E.coli* et *Salmonella Montevideo* avec des diamètres d'inhibition de 33 mm et 34 mm respectivement.

Les deux isolats Myx10 et MyxA n'ont présenté aucune activité antibactérienne.

D'après **Orhan et al, (2012)**, l'activité antibactérienne peut être exprimé, selon quatre niveaux d'activité :

$D < 8$ mm : bactérie non sensible ;

$9 < D < 14$ mm : bactérie sensible ;

$15 < D < 19$ mm : bactérie très sensible ;

$D > 20$ mm : bactérie extrêmement sensible.

On note ici que nos résultats sont intéressante de point de vu le diamètre de la zone d'inhibition car des résultats mentionnés par **Rana et al, (2019)** où 3 souches myxobactériennes isolées sont testés vis-à-vis les 5 souches bactériennes pathogènes : *E.coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Streptomyces coelicolor*, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). Les 3 souches myxobactériennes sont actives avec des zones d'inhibition entre 4.66 et 5.66 mm de diamètres contre *E.coli* et 2 souches sont active avec une zones d'inhibition 7 et 9.33 mm de diamètres contre *Staphylococcus aureus*.

IV-6 -2 Technique de cylindres d'agar :

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 10. Les valeurs mentionnées dans le tableau et la (**Figure 32**) représentent les diamètres des zones d'inhibition mesurées autour du cylindre d'agar posés sur le milieu contenant la souche indicatriceensemencée en surface. L'effet inhibiteur (**Figure 33**) est obtenu par la diffusion de la substance bioactive en milieu gélosé.

Tableau 10 : Résultat de l'activité antibactérienne des trois isolats contre les cinq souches indicatrices déterminées par la méthode de cylindres d'agar.

Les isolats	Diamètre des zones d'inhibition (mm)				
	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.monteridea</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B.cereus</i>
Myx A	0	0	0	0	10
Myx 10	0	0	0	0	0
Myx 2.5	0	0	0	17	11

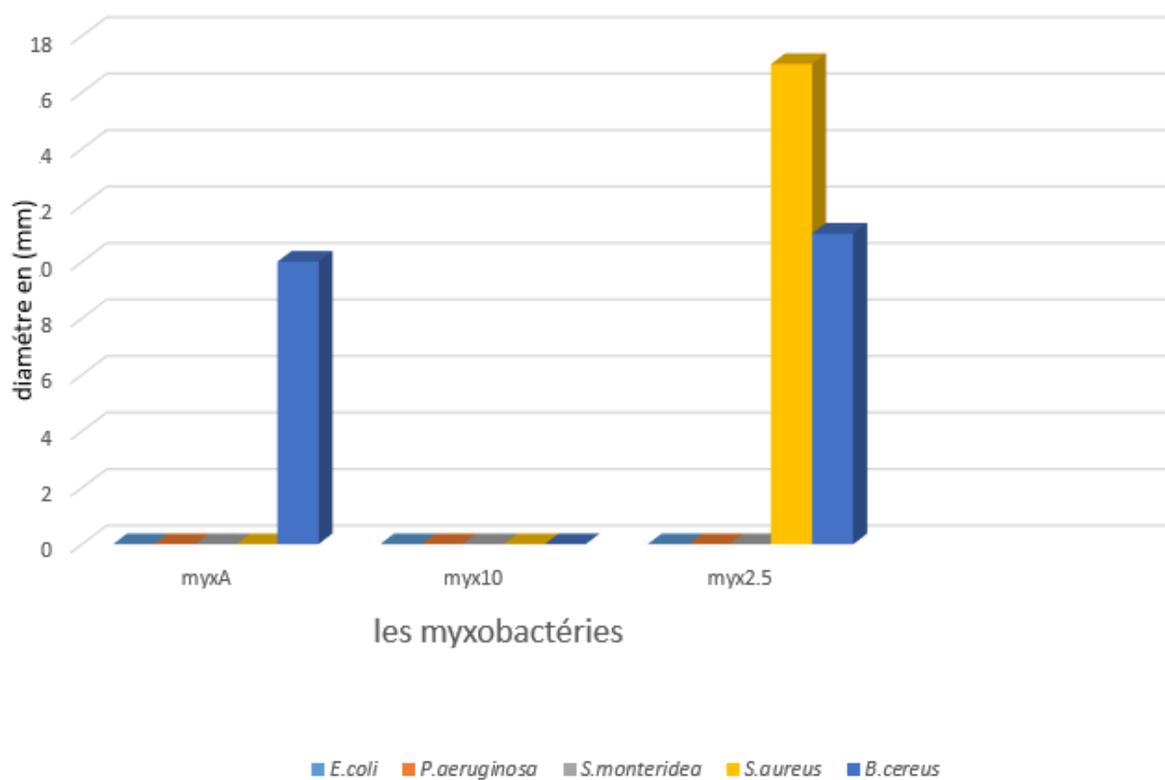


Figure 32 : Un diagramme représente le diamètre des zones d’inhibition des trois isolats contre les cinq souches pathogènes tests (Technique de cylindres d’agar).

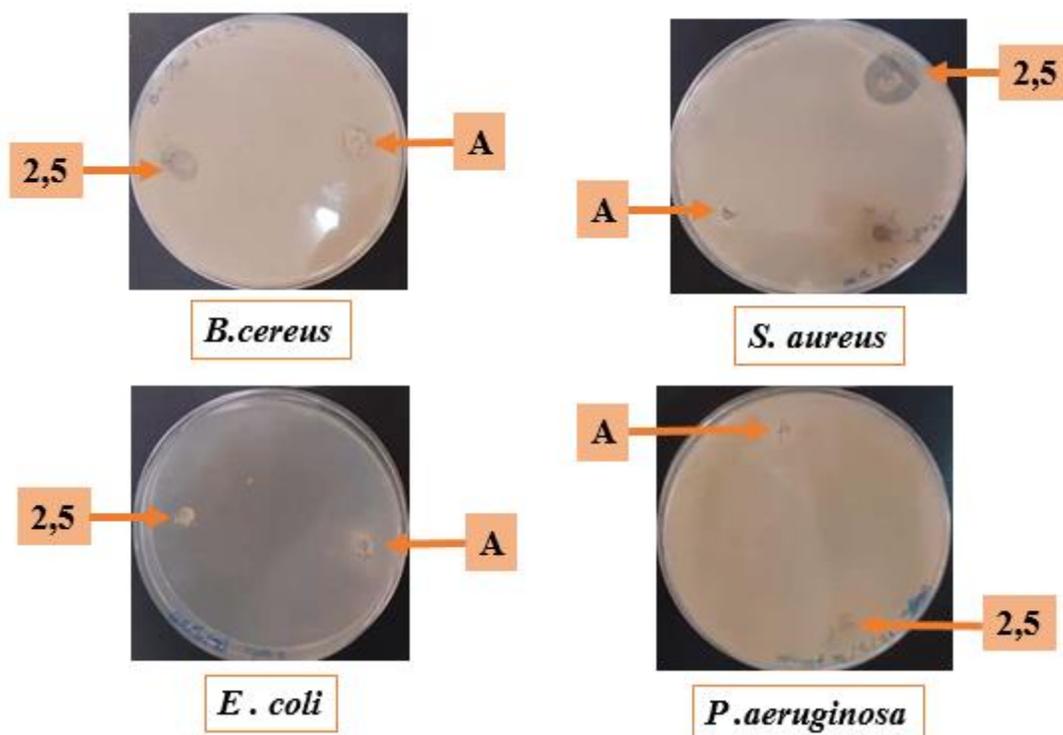


Figure 33 : L'activité antibactérienne de deux isolats : MyxA et Myx2.5 contre les souches indicatrices (Technique de cylindres d'agar).

D'après le (Tableau 09) l'isolat MyxA présente une activité antibactérienne seulement contre *Bacillus cereus* avec un diamètre d'inhibition de 10 mm. Alors que l'isolat Myx2.5 agit sur les deux bactéries Gram positif : *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 17 mm et avec un diamètre d'inhibition de 11 mm contre *Bacillus cereus*. l'isolat Myx10 n'a présenté aucune activité contre les 5 souches indicatrices.

Conclusion et perspectives

L'évolution constante de la résistance bactérienne aux antibiotiques est rapide de plus en plus, ce qui provoque des insuffisances de la thérapeutique antibactérienne, ou des échecs thérapeutiques. Ces raisons font l'objectif de chercher des nouvelles molécules à activité antibactérienne.

Comme chaque nouvelle substance naturelle bioactive, les nouveaux métabolites myxobactériennes sont en premier lieu un défi pour la science.

Les myxobactéries sont des bactéries unicellulaires qui se caractérisent par des comportements multicellulaires compliqués, tels que l'alimentation, le mouvement social, l'agrégation et la formation du corps fruitier, qui les rendent très inhabituelles. Les myxobactéries ont généralement été considérées comme des bactéries du sol en raison de leur exigence particulière pour le comportement social. Cependant, les myxobactéries ont été trouvées plusieurs fois dans divers échantillons marins. Il a été généralement admis que les myxobactéries peuvent vivre dans l'océan. Mais comment les « myxobactéries marines » se développent et développent leurs formes de repos est encore inconnue.

Dans l'ensemble, notre travail consiste à l'isolement sélectif des souches Myxobactériens productrices des substances bioactives à partir de 9 échantillons prélevés de différents écosystèmes naturels de l'Algérie : le sol de zone humide au niveau de la wilaya d'Aïn temouchent, le sol de la zone semi-aride dans la wilaya de Saïda (Ain zerga, Moulay Larbi et Daoud), le sol de la zone aride dans la wilaya de Bechar, 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). Afin d'avoir une diversité d'isolats.

L'isolement se fait par plusieurs méthodes : isolement du sol 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. La purification s'effectue à partir des essaims, des fructifications qui sont transférées sur des boîtes pétri contenant la gélose CY par dépôt.

D'après la littérature, il est clair qu'ils ont un effet antagoniste contre de nombreux agents pathogènes humains, végétaux et animaux.

Les isolats myxobactériennes montrés des activités antibactériennes. En dehors de cela, des souches isolées peuvent également hydrolyser la caséine. Parmi les treize souches myxobactériennes isolés

par la méthode d'appâtage avec des granulés de fumier de lapin ; deux souches ont une activité antibactériennes : MyxA isolé de Sédiment de mère de Salamandre et Myx2.5 isolé de Sédiment de mère de Sablet. En outre, l'isolement des myxobactéries du sédiment de mer de Sablet et Salamandre de Mostaganem est le domaine de recherche à venir.

La souche Myx2.5 vis-à-vis *P.auruginosa* avec une zone d'inhibition de 22mm de diamètre, *S.montivideo* avec zone d'inhibition de 34mm de diamètre, *B.cereus* avec zone d'inhibition de 26mm de diamètre et *E.coli* avec une zone d'inhibition de 33mm de diamètre obtenue par méthode de Fleming. Aussi par la méthode de cylindre d'agar elle a une activité contre *B.cereus* avec zone d'inhibition de 11mm de diamètre, *S. aureus* avec une zone d'inhibition de 17mm de diamètre. Et la souche MyxA a une activité contre *B.cereus* avec zone d'inhibition de 10mm de diamètre obtenue par la méthode de cylindre d'agar.

Il pourrait être possible d'isoler davantage de souches de myxobactéries à partir d'échantillons de sol marin. L'une des méthodes qui pourraient être utilisées pour obtenir de nouvelles souches de myxobactéries et d'utiliser différents organismes alimentaires plutôt que *E. coli*.

Enfin, après que tant de métabolites secondaires myxobactériennes ont été caractérisés, les organismes sont maintenant fermement établis comme un nouveau groupe de producteurs de métabolites secondaires intéressants et potentiellement utiles. Rend probable que ces micro-organismes nous fourniront de nombreux nouveaux métabolites conduits de médicaments à l'avenir dont l'antibiotique prometteur, antiviral, antifongique, ou l'activité anticancéreuse et activité enzymatique qui avaient conduit à un intérêt considérable dans leurs applications dans les industries pharmaceutiques et agrochimiques.

Cette étude pourrait, espérons-le, jeter les bases de nouvelles études sur les myxobactéries Algériennes.

Référence bibliographique

Référence bibliographique :

- **Algoud, M. (2018).** « Concentrations Minimales Inhibitrices des Bêta-Lactamines de Streptococcus pneumoniae en Milieu Liquide et Par la Méthode e-Test Comparaison de Méthodes». Thèse Docteur en Pharmacie. Marseille : Université d'Aix-Marseille, 174p.
- **Amara, S. Bouhoursa, A. (2019).** «Isolement et Caractérisation des Actinomycètes Productrices des Antibiotiques et des Lipides, et mise en Evidence de leurs Pouvoirs Antibactériens vis-à-vis Pseudomonas aeruginosa et Bacillus subtilis». Master en Sciences Biologiques, Mostaganem : Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem ,89 p.
- **Aachambaud, M. (2009).** «Méthodes d'Evaluation de l'Activité des Antibiotiques in Vitro Laboratoire Bactériologie-Hygiène».CHU Rangueil Toulouse, P 23, 24, 33,34. disponible :https://medecine.upstlse.fr/pcm2/bacteriologie/Evaluation_activite_antibiotiques.pdf
- **Avril. L.J., Dabernat. H. , Denis. F., Monteil. H. (1992).** «Bacteriologie Clinique». 2ème édition. Edition marketing. 32, rue Bargu 75015 Paris : Editeur des préparations grandes écoles medecine, 512P (ISBN 2-7298-9218-4).
- **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.
- **Benzeggouta N. (2005).** « Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments». L'Obtention du Diplôme de Magister en Pharmacochimie : Université Mentouri de Constantine, 153p.
- **Bergogne-Berezine, E., Dellamonica, P. (1995).** «Antibiotrapie en Pratique Clinique : Activité Antibactérienne. Spectre. Mode d'action. Cibles bactériennes». Masson , p17-32.
- **Boubrit. S., Bousad. N. (2007).** «Détermination "in vitro " du Pouvoir Antibactérien des Huiles Essentielles d'Eucalyptus, Myrte, Clous de Girofle et Sarriette, et leur Application à la Conservation de la Viande Fraîche Type Hachée».[en ligne]. Mémoire d'Ingénieur d'état en biologie. Tizi-ouzou: Université Mouloud Mammeri. Disponible sur: https://www.memoireonline.com/10/11/4897/m_Determination-in-vitro--du-pouvoir-antibacterien-des-huiles-essentielles-deucalyptus-myrte-15.html(Consulté le 22/07/2020).

- **Bousseboua, H. (2005).** «Eléments de Microbiologie Générale». Constantine : Campus club. p167-172.
- **Bramki, A., Ghorri S., Jaouani A., Dehimat L. (2017).** « Antibacterial Activity of Aspergillus Isolated From Different Algerian Ecosystems». *African Journal of Biotechnology* [en ligne]. Vol. 16, pp. 1699-1704
- **Brinkhoff. Th., Fische. D., Vollmers. J., Voget. S., Beardsley. C, Thole. S. (2012).** « Biogeography and Phylogenetic Diversity of a Cluster of Exclusively Marine Myxobacteria ». International Society for Microbial Ecology. Vol.6, p.1260–1272.
- **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.
- **Dawid,W. (2000).** «Biology and Global Distribution of Myxobacteria in Soils». *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 24, No. 2000, p. 403-427.
- **Demain, A-L., Lancini, G. (2006).** «Procaroyotes: Bacterial Pharmaceutical Products».3ème edition, New York, Springer, 1, p 812–833.
- **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- Moulinaux cedex, 573P (ISBN: 978-2-2'1-1-0117!·6).
- **Dworkin, M. (1966).** «Biology of the Myxobacteria». *The Annual Review of Microbiology*, Vol. 20, p. 75-102.
- **Figarella J., Leyral G., Terret M. (2007).** «Microbiologie Générale et Appliquée». France : Delgrave Edition,.P102,104, 106, 107,108.
- **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 Phylogenetics and Evolution*, pp. 879-887.
- **Gaudy, C., Buxeraud, J. (2005).** «*Antibiotiques : Pharmacologie et Thérapeutique*». Paris : Elsevier .P 14,23, 24.
- **Gerth,K , Pradella,S, ...,et al. (2003).** «Myxobacteria: Proficient Producers of Novel Natural Products With Various Biological Activities—Past and Future Biotechnological Aspects With The Focus On The Genus *Sorangium*». *Journal of Biotechnology*, Vol. 106, No. 2003, p. 233-253.
- **Gouasmia R., Hechania, M. (2015).** «Usage des Antibiotiques En Elevage et Risque Sur La Santé Humaine». Master en Sciences Biologiques. Guelma : Université 8 Mai 1945.p84.
- **Gregory. K.C. (2019).** « Survey of Biosynthetic Gene Clusters From Sequenced Myxobacteria and Analysis of Potential Metabolic Diversity». Partial fulfillment of the requirements of the Sally McDonnell Barksdale Honors College. Mississippi: the faculty of the University of Mississippi, pp. 24.
- **Harold, C.N. (1992).** «The Crisis in Antibiotic Resistance». *Science*, vol. 257, p.1064–1073.
- **Harwani,D. (2017).** «Myxobacteria as a Promising Source of Novel Natural Products». *Ijrasnet*. Vol.5, p. 2654-2660.
- **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 coralloyronins, 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.

- **Krug, D., Zurek, G., Revermann, O., Vos, M., Gregory, J.V., Müller, R. (2008).** «Discovering the Hidden Secondary Metabolome of *Myxococcus xanthus*: a Study of Intraspecific Diversity». *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.74, No. 10, p. 3058–3068.
- **Kunze, B., Holfe, G., Reichnbach, H. (1987).** « The aurachins, New Quinoline Antibiotics from Myxobacteria: Production, Physico-Chemical and Biological Properties». *The Journal of Antibiotics*, Vol. xl no. 3, p.258-265
- **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.
- **Labayle, D. (2001).** «Guide Pharmac». édition lamare , Paris, p.568.
- **Lalsiamthara, J., Lee, H.J. (2017).** «Pathogenic Traits of *Salmonella montevideo* in Experimental Infections In Vivo and in Vitro». *Scientific reports* [en ligne]. Vol. 7, 46232; doi: 10.1038/srep46232, P.12.
- **Laurent, F. (2009).** «Principales β -lactamines : Pénicillines G, A, M, inhibiteurs de β -lactamases, Uréidopénicillines, Carboxypénicillines C1G, C2G, C3G, Monobactames Carbapénèmes». Laboratoire de Microbiologie Groupement Hospitalier, Nord Lyon. P 8.
- **Lesseur, 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.
- **Mangin, L. (2016).** «Antibiotiques et Résistances : Enquête sur les connaissances et les comportements du grand public». Thèse Docteur en Pharmacie. Nancy : Université de lorraine, 124p.
- **Mazaikina, V. (2016).** « Marine myxobacteria as a Source of Antibiotics». *The academic Degree Bachelor of Engineering* (B.Eng.). Germany: Ostfalia University of Applied

Sciences Faculty of Supply Engineering Study Program Bio- and Environmental Engineering, p.61

- **Mazri, R. (2009).** «Approche des Relations Structure-Activités Dans Des Nouveaux Macrodiolides Antibiotiques Basée sur la Mécanique Moléculaire». Thèse. Biskra : Université Mouhamed Khider, <http://thesis.univ-biskra.dz/311/8/Chap%201.pdf>
- **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 (Consulté le 23/06/2020).
- **Meyer, A., Deiana, J., Bernard, A. (2004).** « Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés ». 2eme edition, Paris : Doin, Biosciences et techniques, P 218 – 247.
- **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.
- **Muñoz. D. J., Marcos.Torres. F. J, García. B. E, Moraleda. M. A.,Pérez. J. (2016).** «Myxobacteria: Moving, Killing, feeding, and Surviving Together». *Frontiers in Microbiology*, Vol.7 pp.18.
- **Nadmid Suvd. (2015).** «Isolation and Characterization of Novel Natural Compounds from Myxobacteria». Thèse docteur en sciences, Université de Saarlandes, Allemagne , p.156.
- **Oettmeier, W., Dostatni, R., Majewski, C., Höfle, G., Fecker, T., Kunze, B., Reichenbach, H. (1990).** «The Aurachins, Naturally Occurring Inhibitors of Photosynthetic Electron Flow through Photosystem II and the Cytochrome b_j f-Complex». p. 322-328.
- **Ouargli. M. (2018).** «Les actinomycètes producteurs de molécules bioactive».[en ligne]. Thèse en Microbiologie. Annaba : Université Badji mokhtar, 189p. Disponible sur :

<http://biblio.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2019/09/These-Ouargli-Moufida.pdf> (Consulté le 04/06/2020).

- **Perry, J-J., Staley, J-T., Lory, S. (2004).** «Microbiologie». Paris: Dunod, p497– 498.
- **Petit, F., Guespin-Michel, J F. (1992).** «Production of an extracellular milk-clotting activity during development in *Myxococcus xanthus*». *Journal of bacteriology*, vol. 15, p.5136-5140.
- **Piel, A. (2010).** «Biosynthesis of polyketides by trans-ATpolyketide synthases».Natural product reports, Vol. 27, p. 996-1047.
- **Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., (2003).** « Microbiologie». 2eme edition, Berlin: De boeck. p 539. . ISBN-10: 2804142566
- **Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., (2007).** « Microbiologie». 2eme edition, bruxelles : De boeck, p 1088.
- **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.
- **Schaberle. T.F., Lohr. F., Schmitz. A., Konig. G.M. (2014).** «Antibiotics from Myxobacteria». *Royal Society of Chemistry*.

- **Schmitz, A., Felder, S., Höver, T., Kehraus, S., Neu, E., Lohr, F., Gabriele M. König, Till F. Schäberle. (2013).** «Antibiotics from Gliding Bacteria». *Phytochemistry Reviews*, Vol. 12, p. 507-516.
- **Shimkets, L. J. (1990).** «Social and Developmental Biology of the Myxobacteria». *American Society for Microbiology*. Vol. 54, No. 4, p. 473-501.
- **Smaoui, S. (2010).** «Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de Microorganismes Nouvellement Isolés et Identifiés ». thèse de doctorat, Université de Toulouse, France, pp187.
- **Stephen, P.D., Norman, H., Sean, P.G., Brendan, G. (2011).** «Hugo and Russell's: Pharmaceutical Microbiology ». 8ème édition, Grande-bretagne, Eighth Edition, 495p. ISBN 9781444330632.
- **Sugathan. S., Pradeep. N.S., Sabu .A. (2017).** « Bioresources and bioprocess in biotechnology ». *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology*, ISBN: 9789811035739 (9811035733).
- **Talbert. M., Willoquet.G., Gevrvais. R. (2009).** « Pharmacologie clinique ». France : Wolters Kluwer, P 641, 648,655.
- **Teyssou. R., Hance. P., Nicand. E., Nizou. Y.J., Buisson. Y. (1998).** «Les infections à Bacillus cereus : Bactériologie, Clinique et Traitement». *La Lettre de l'Infectiologue [en ligne]*. Tome XIII, n° 3,P.6. Disponible sur : <https://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/9830.pdf> (Consulté le 24/07/2020).
- **Tortora J., Funk B.F., Case Ch.I. (2003).** «Introduction à la microbiologie». Erpi, Canada, pp :968. ISBN978-2-7613-1345-2
- **Velicer GJ, Vos M. (2009).** «Sociobiology of The Myxobacteria». *The Annual Review of Microbiology*, Vol. 63, p. 599-623.
- **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).

- **Eied. Y.F.A (2013).** «Isolation, Characterization and Biological Activities of Egyptian Myxobacteria».Thèse Degree of Ph.D in Agricultural Microbiology, Université de Fayoum, Egypt, p.82.
- **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.
- **Zhang. Q.Y., Li. Z.Y., Wang. B., Wu. H.Z., Zhang. Y.C., Gong. X. (2005).** «Characteristics and Living Patterns of Marine Myxobacterial Isolates». Applied and Environmental Microbiology, Vol. 71, No. 6, p. 3331–3336

Annexes

Les milieux de culture

Préparation de la solution de cycloheximide :

(25 μ g cycloheximide / 100 ml de l'eau distillé stérile).

Stan21 Agar

Solution A:

K₂HPO₄ 1g

Extrait de levure (Difco) 0,02g

Agar 10g

Eau distillée 700.00ml

Solution B:

KNO₃ 1g

MgSO₄-7H₂O 1g

CaCl₂ · 2H₂O 1g

FeCl, 0,2g

MnSO₄-7H₂O 0,1g

Eau distillée 300.00ml

Après autoclavage séparément, les solutions A et B sont combinées

WCX Agar

CaCl₂·2H₂O 1g

Agar 15g

Après autoclavage, ajouté 25 μ g /ml cycloheximide

VY/2 Agar

Levure de boulangerie 5g

CaCl₂-2H₂O 1g

Cyanocobalamine 0,5 µg /ml

Agar 15,00 g

Eau distillée qsp 1000.00 ml

Ph 7.2

CY -AGAR

Casitone 3,00 g

CaCl₂ x 2 H₂O 1,36 g

Extrait de levure 1,00 g

Agar 15,00 g

Eau distillée qsp 1000.00 ml

Ph 7.2

CY -liquide

Casitone 3,00 g

CaCl₂ x 2 H₂O 1,36 g

Extrait de levure 1,00 g

Eau distillée qsp 1000.00 ml

Ph 7.2

Milieu LB solide

Treptone 10g

Extrais de levure 5g

Na Cl 10g

Agar 20g

Eau distilles qsp 1000.00 ml

PH : 7,2

Milieu LB Liquide

Treptone 10g

Extrais de levure 5g

Na Cl.....10g Eau distilles ... 1000ml

PH : 7,2

Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf 300,0ml

Peptone de caséine : 17,5g

Amidon de maïs : 1,5g

Agar : 17,0 g

Ph 7,4

Bouillon nutritif

Peptone 10 g

Extrait de levure 5 g

Na Cl 5 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 7,2

Eau physiologie

Na Cl 9g

Eau distillée 1000ml

TSE

Tryptone 1g

NaCl 8,5g

Eau distillée qsp 1000ml

Les colorants

Lugol

Iode 1g

Iode de potassium 2g

Eau distillée 300m

Violet de gentiane

Violet de gentiane 1g

Ethanol à90 10g

Phénol 2g

Eau distillés 1000ml

Fuchsine

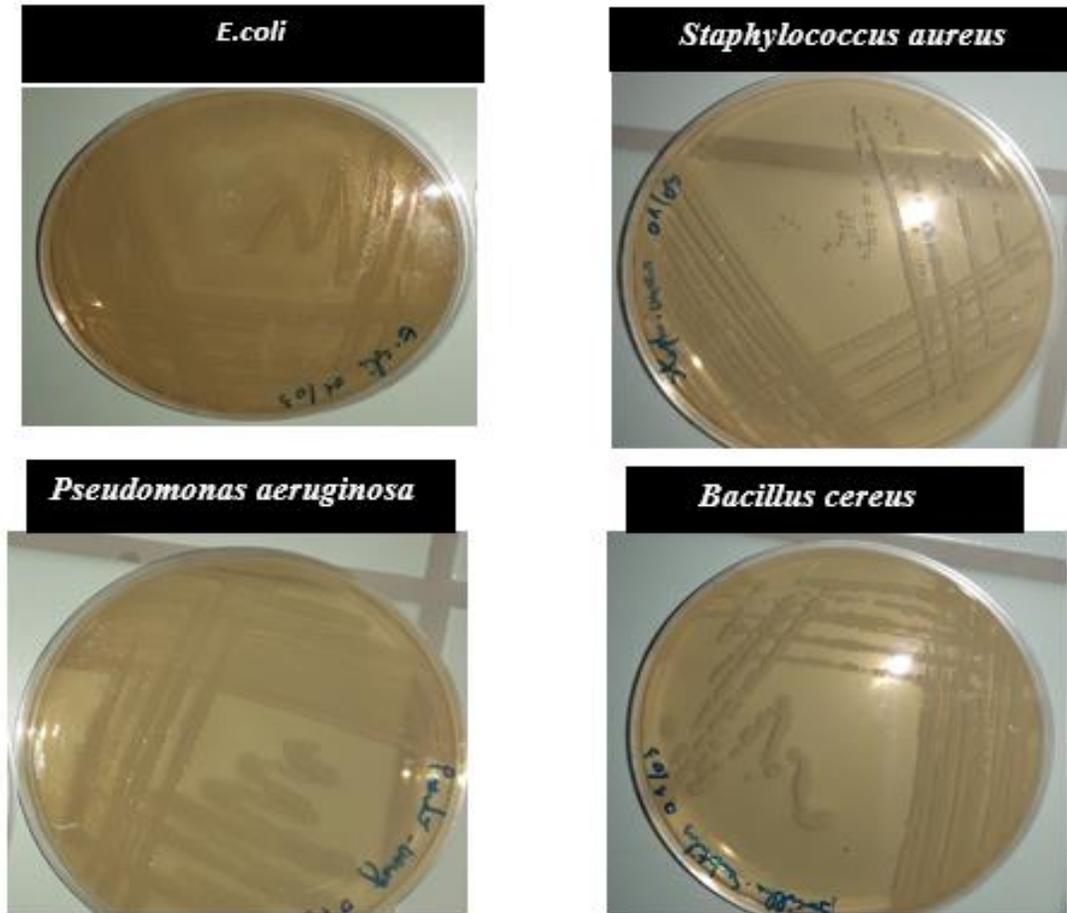
Fuchsine basique 02g

Acide phénique 10g

Alcool absolu 20ml

➤ **La procédure de coloration de Gram**

- Réaliser un frottis et le fixer.
- Coloration : violet de gentiane (Annexe) phéniqué durant une minute. Toutes les bactéries prennent ce colorant et sont donc colorées en violet.
- rincer à l'eau distillée.
- Recouvrir la lame de réactif de lugol (Annexe) 1 minute (réactif iodo-ioduré qui accentue la coloration).
- Rincer à l'eau distillée.
- Epreuve (alcoolo résistance) : Plonger 3 ou 4 fois une demi-seconde dans un pot d'alcool puis rincé à l'eau distillée immédiatement. Pendant cette étape, les lipides de la paroi des Gram négative sont dissous et l'alcool peut donc pénétrer à l'intérieure de la bactérie et expulser le violet de gentiane. Les bactéries à Gram négative sont alcoolo-sensibles et sont donc décolorées. La paroi des Gram positive ne laisse pas passer l'alcool et sont dites alcoolo-résistantes et restent colorées en violet.
- Contre coloration : Fuschine (Annexe) diluée au 1/20^{ème} ou de safranine pendant une minute. Toutes les bactéries prennent le colorant mais le violet masque la fuschine (Annexe). Les « Gram positives » apparaissent donc violette, les « Gram négatives », recolorées par la fuschine (Annexe), apparaissent roses.
- Rincer à l'eau distillée et sécher entre deux feuilles de papier absorbant.
- Observer à l'objectif 100 à immersion, à pleine lumière.



Annexe 1 : Aspect macroscopique des souches indicatrices

Annexe 2 : Vérification de la pureté des souches indicatrices :

	Coloration de Gram	Test catalase	Test oxydase
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	Des Bacilles Gram positif	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATTC 25923)	Des Cocci Gram positif	+	-
<i>Salmonella</i> <u>Montevideo</u> (ATCC 3581).	Des Bacilles Gram négatif	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Des Bacilles Gram négatif	+	+
<i>Escherichia coli</i> (ATTC 25922)	Des Bacilles Gram négatif	+	-

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, ou des échecs thérapeutiques. Ces raisons font l'objectif de chercher des nouvelles molécules à activité antibactérienne. Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la recherche des myxobactéries productrices de molécules bioactifs à partir de différents écosystèmes naturels. Neuf sites d'échantillonnage sont choisis pour réaliser l'isolement de ces microorganismes. Ils sont répartis sur les différentes zones écologiques et climatologiques de l'Algérie (Sédiments marins et sol de la zone humide, semi aride, aride et saharien). Trois méthodes d'isolement sont utilisées à savoir la technique d'isolement des myxobactéries à l'aide de papier filtre, la méthode des séquences d'*Escherichia coli* et la méthode des granulés de fumier de lapin. Treize isolats sont obtenus et caractérisés phénotypiquement comme étant des myxobactéries. Trois parmi eux sont retenus pour l'étude de l'activité antibactérienne. Cette dernière est réalisée par la méthode de Fleming (contacte directe entre la souche productrice et la souche indicatrice) et par la technique des cylindres d'agar. Cinq bactéries indicatrices sont utilisées dont deux à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*) et trois à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Montevideo*). Deux isolats sur trois ont montré une activité antibactérienne avec des résultats intéressants marqués par la souche Myx 2.5 qui a inhibée toutes les souches indicatrices à l'exception de *Staphylococcus aureus*. L'activité antagoniste exercée par cet isolat s'avère très importante avec des zones d'inhibitions allant de 22 à 34 millimètres de diamètre. D'après ces résultats préliminaires, les sédiments marins semblent des sources intéressantes pour l'obtention de souches et/ou molécules nouvelles.

Mots clés : Myxobactéries ; Sol Algérien ; Molécule bioactifs ; Activité antibactérienne.

Summary

The constant evolution of bacterial resistance to antibiotics is increasingly rapid, causing deficiencies in antibacterial therapy, or therapeutic failures. These reasons are aimed at looking for new molecules with antibacterial activity. In this research, we were interested in finding a myxobacteria that produce bioactive molecules from different natural ecosystems. Nine sampling sites are selected to perform the isolation of these microorganisms. They are spread over the different ecological and climatological zones of Algeria (marine sediments and soil of the wetland, semi-arid, arid and Saharan). Three methods of isolation have been used: the technique of Inoculation of filter paper with soil, the method of Baiting with *Escherichia coli* streaks and the method of Baiting with dung pellets. Thirteen isolates are obtained and phenotypically characterized as myxobacteria. Three of them are selected for the study of antibacterial activity. The latter is carried out by the Fleming method (direct contact between the producing and the indicator strain) and by the technique of the agar cylinders. Five indicator bacteria are used including two gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*) and three Gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Montevideo*). Two out of three isolates showed antibacterial activity with interesting results marked by the Myx 2.5 strain that inhibited all indicator strains except *Staphylococcus aureus*. The antagonistic activity exerted by this isolate is very important with areas of inhibitions ranging from 22 to 34 millimeters in diameter. Based on these preliminary results, marine sediments appear to be attractive sources for obtaining new strains and/or molecules.

Key words: Myxobacteria, Soil Algerian, Bioactive molecules, antibacterial activity.

ملخص

مقاومة البكتيريا ضد المضادات الحيوية دائما في تطور مستمر مما يؤدي إلى فشل العلاج بالمضادات الحيوية. وهذا ما كان سبب من أجل البحث عن مركبات جديدة ذات نشاط حيوي. من خلال هذا العمل تم تركيز الإهتمام في البحث عن الميكسوبكتيريا المنتجة لمركبات مضادة للبكتيريا من خلال مختلف النظم الإيكولوجية الطبيعية. تم اختيار تسعة مواقع لأخذ العينات لعزل هذه الكائنات الحية الدقيقة والمتوزعة في مختلف المناطق الإيكولوجية والمناخية في الجزائر (الرواسب البحرية وتربة الأراضي الرطبة وشبه القاحلة والقاحلة والصحراوية). تم استخدام ثلاث طرق لعملية العزل: عزل الميكسوبكتيريا عن طريق ورق الترشيح السليلوزي، عن طريق قطع خلايا *Escherichia coli* وعن طريق كريات سماد الأرنب. تم الحصول على ثلاثة عشر عزلات من الميكسوبكتيريا المتعرف عليها من خلال مظهرها الخارجي. تم اختيار ثلاثة منهم لاختبار نشاط المضاد الحيوي. يتم تنفيذ هذا الأخير من خلال طريقة فليمنغ (الإتصال المباشر بين السلالة المنتجة والسلالة الممرضة) وتقنية أسطوانة الأجار. تم استخدام خمسة بكتيريا ممرضة: ثلاث منها إيجابية الغرام (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*) وثلاثة منها سلبية الغرام (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Montevideo*). أظهرت إثنان من أصل ثلاث عزلات أن لديهم نشاط حيوي مع نتائج مثيرة للإهتمام تمثلت في السلالة Myx2.5 التي تمكنت من منع نمو السلالات الممرضة باستثناء *Staphylococcus aureus*. النشاط التنافسي الذي يمارسه هذا العزل مهم جدا مع مناطق التثبيط التي تتراوح بين 22 إلى 34 ملم في القطر. إستنادا إلى هذه النتائج الأولية يبدو أن الرواسب البحرية هي مصادر مهمة للحصول على سلالات و/أو مركبات جديدة.

الكلمات المفتاحية: الميكسوبكتيريا، تربة الجزائر، الجزيئات البيولوجية النشطة، نشاط مضاد للبكتيريا.