

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة مولاي الطاهر، سعيدة

Université MOULAY Tahar, Saïda



Laboratoire de biotoxicologie,
pharmacognosie et valorisation
biologique des plantes

N° d'Ordre



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Isolement des Myxobactéries productrices de substances bioactives de différents biotopes naturels d'Algérie

Présenté par :

- Mr : Abdelkerim younes
- Mr : Benarbia Mohamed El Walid
- Soutenu le : 29 /06/2022

Devant le jury composé de :

President
Examineur
Rapporteur

Mr. ADLI Djallal Eddine Houari
Mr. GHELLAI Lotfi
Mr. BENREGUIEG Mokhtar

MCA Université de saïda
MCA Université de saïda
MCA Université de saïda

Année universitaire 2021/2022

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة مولاي الطاهر، سعيدة

Université MOULAY Tahar, Saida



Laboratoire de biotoxicologie,
pharmarmacognosie et valorisation
biologique des plantes

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

N° d'Ordre

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Isolement des Myxobactéries productrices de substances bioactives de différents biotopes naturels d'Algérie

Présenté par :

- Mr : Abdelkerim younes
- Mr : Benarbia Mohamed El Walid

Soutenu le : 29 /06/2022

Devant le jury composé de :

President
Examineur
Rapporteur

Mr. ADLI Djallal Eddine Houari
Mr. GHELLAI Lotfi
Mr. BENREGUIEG Mokhtar

MCA Université de Saida
MCA Université de Saida
MCA Université de Saida

Année universitaire 2021/2022

Dédicace

Avec l'aide de Dieu tout puissant, j'ai pu achever ce travail que je dédie :

A ma très chère maman, ma raison de vivre, grâce à elle que je suis la ,pour m'avoir toujours écouté, pour son soutien moral et ces précieux conseils

A toi le plus chère, mon père qui m'a encouragé, qui m'a donné la force, la volonté de surmonter tous les obstacles et les difficultés aidé et guidé vers le chemin de la réussite

*A tous mes cher oncles
Abdelkader ,Abdellah ,Noureddine ,Mourad,Billel ,Moussa qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont donné un encouragement magnifique et persévérant.*

A mes très chers frères :Youcef,Abdelrahmman ,chams el dine,mustapha,Abdelhadi

A mes très chères sœurs : Chahinez,Kawhter,Saadia,Bochra

Confrères: Alae, Walid, Aymen, Nourddine, Youcef, Ahmed,

A toute ma famille paternelle et maternelle

A tous ceux qui mon chers

Younes

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Mes chers parents que nulle dédicace ne puisse s'exprimer, mes sincères sentiments et leur patience illimitée, leur encouragement continu, leur aide et leurs précieux conseils, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices.

A ma très chère sœur Ibtissem et mon frère Khalil, ma grand-mère, ma chère Nour ainsi qu'à mes plus beaux poussins Wissem Aicha et Djawed pour leur grand amour et leur soutien qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute gratitude.

Mes très chers oncles : Kamel, Nabil, Mehdi, Kadiro et Hichem.

Mes chers amis : Zakaria, Younes, Omar et Ghani

Pour leur encouragement.

Et à toute ma famille et à tous ce que j'aime.

Walid

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier « ALLAH » qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

A notre encadrant Mr. Benreguieg M. Que nous remercions très sincèrement pour avoir accepté la responsabilité de ce travail malgré vos nombreuses obligations.

Nous sommes très honorés d'avoir pu bénéficier de vos remarques et de vos compétences tout au long de ces années, on a apprécié votre disponibilité, l'autonomie et la confiance que vous nous avez accordés.

Nos remerciements s'adressent, également, aux membres du jury Mr Adli, et Mr. Ghellai pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre étude en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous remercions également tous nos enseignants, qui nous ont enseignés durant notre parcours universitaire.

Nos sincères remerciements vont aussi à Mr. Adli .D.E, Ghellai L et Mr. Halla N. Mm. Hadjadj H, Mr. Mderbel, Mr. Ziani K, Mr.bellil Y

Un grand merci à l'ingénieur du laboratoire de Saida-Faculté des sciences Mr. Benmhamed

En fin, nous remercions toute la promotion de biologie master II de l'année 2022 (Microbiologie appliquée).

Et tous qui ont tous contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

NRP : Non Ribosomal Peptides

NRPS : Non Ribosomal Peptides Synthase

PK :Polyketides

PKS : Polyketides Synthase

ATCC: American Type Culture Collection

PH: Potentiel hydrogène

Mg: Milligramme

µm: Microgramme

Nm: Nanomètre

NCBI: National Center for Biotechnology Information

UFC: Unité formant colonie

Mb: Megabase

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique

NADH : hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide

CCM : Chromatographie sur couche mince

UV : Ultraviolet

AceOt : Acétat de methyl

MeOH : Methanol.

Rf : Référence frontale

G : Grossissement

Liste des tableaux

Tableau 1 : Certains métabolites secondaires produits par les myxobactéries.....	18
Tableau 2 : les méthodes utilisées et leurs codes.....	26
Tableau 3 : les isolats et leurs codes.....	26
Tableau 4 : les bactéries cibles leurs codes ATCC.....	27
Tableau 5 : les isolats obtenus par chaque méthode.....	36
Tableau 6 : résultat du test catalase sur les souches cibles.....	40
Tableau 7 : Résultat de l'activité antibactérienne des neuf isolats contre les six souches indicatrices déterminées par la méthode de cylindres d'agar.....	41
Tableau 8 : Le diamètre des zones d'inhibition des deux extraits contre les deux souches pathogènes tests (Technique de puits).....	44
Tableau 9 : Référence frontale de chaque molécule.....	47

Liste des figures

Figure 1 : Taxonomie actuelle de l'ordre des <i>Myxococcale</i> (Mohr 2018).....	08
Figure 2 : Micrographies électroniques à balayage de formation de corps fructifiés chez <i>Chondromyces crocatus</i> , la structure finale mesure 600µm d'hauteur (Madigan et al.,2015).....	09
Figure 3 : cycle de vie de la bactérie <i>Myxococcus xanthus</i>	10
Figure 4 : Une sélection de produits naturels isolés à partir d'extraits de myxobactéries marines.....	12
Figure 5 : Structures chimique de certains métabolites Myxobactériens bioactifs (Garcia et al.,2009).....	16
Figure 6 : Structures chimique de certains métabolites Myxobactériens bioactifs (Garcia et al.,2009).....	17
Figure 7 : la méthode de collecte.....	22
Figure 8 : Les Zones de prélèvement.....	22
Figure 9 : Carte géographique montrant les zones de prélèvement des échantillons (Google maps).....	23
Figure 10 : méthode de papier filtre.....	24
Figure 11 : méthode de fumier de lapin.....	24
Figure 12 : méthode de proie bacterienne	25
Figure 13 : méthode de E.coli morte.....	26
Figure 14 : illustration résumant les étapes de l'extraction des métabolites bioactives à partir du milieu solide CY	29
Figure 15 : méthode de diffusion sur gélose.....	30
Figure 16 : Conservation dans les eppendorfs.....	32
Figure 17 : L'isolement par méthode de papier filtre.....	34
Figure 18 : L'isolement par méthode de fumier de lapin.....	34
Figure 19 : L'isolement par méthode <i>E. coli</i> vivante.....	35
Figure 20 : L'isolement par méthode <i>E. coli</i> morte.....	35
Figure 21 : Observation directe de corps de fructification Myxobactériens par loupe binoculaire Gx20.....	37
Figure 22 : les essais des Myxobacteries.....	38
Figure 23 : observation des essais sous loupe binoculaire X20.....	38
Figure 24 : observation microscopique des Myxobacéries a l'état frais.....	38
Figure 25 : observation microscopique des cellules myxobactériennes végétatives colorés par le bleu de méthylène.....	38
Figure 26 : observation microscopique par coloration de gram.....	38
Figure 27 : purification des isolats myxobactériennes	39
Figure 28 : Un diagramme représente le diamètre des zones d'inhibition des neuf isolats contre les six souches pathogènes tests (Technique de cylindres d'agar).....	41
Figure 29 : L'activité antibactérienne des isolats Myxobactériennes contre les souches indicatrices (Technique de cylindres d'agar).....	43
Figure 30 : L'activité antibactérienne des deux extraits.....	44
Figure 31 : l'activité de l'extrait N°1 sur <i>Bacillus</i>	44
Figure 32 : Résultats de différents systèmes de séparation.....	45
Figure 33 : Observation de la plaque CCM sous lampe U-V à 254 nm	46
Figure 34 : Observation de la plaque CCM sous lampe U-V à 366 nm.....	47
Figure 35 : Teste des extraits des molécules.....	47

Résumé

Les myxobactéries qui sont des bactéries à Gram négative appartiennent au groupe protéobactéries sont considérés comme une excellente source de métabolites bioactifs. Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à la recherche de ces microorganismes dans différents biotopes naturels de l'Algérie. Les échantillons sont prélevés à partir de deux sites pour les sédiments marins et de trois sols rhizosphérique des trois plantes *Ziziphus*, *Artemisia*, *Pistacia lentiscous*. L'isolement est effectué en utilisant quatre méthodes, les deux premières visent à rechercher les Myxobactéries cellulolytiques (méthode de papier filtre et méthode de fumier de lapin) alors que les deux autres visent la sélection des micro-prédateurs de ce groupe bactérien *Escherichia coli* vivante et morte. Les sédiments marins s'avèrent les plus riches en myxobactéries. Au total, 19 isolats myxobactériens sont obtenus sur différents échantillons et par différentes méthodes. Le screening primaire est réalisé par la technique de cylindres d'agar contre cinq bactéries indicatrices (*E coli*, *Pseudomonas Staphylococcus aureus MRSA*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*). Six isolats soit 31% sur 19 ont donné une activité antibactérienne. En se basant sur le spectre d'activité, deux isolats S16s MI et S27s MIV sont retenus pour réaliser une fermentation sur le milieu CY. La caractérisation préliminaire de l'extrait brut par CCM nous a permis de sélectionner la proportion des solvants adéquats de la phase mobile, il s'agit de l'acétate d'éthyle /méthanol (9/1). Cette technique a permis de séparer l'extrait en trois fractions. Le screening secondaire par la méthode des puits a montré que les deux extraits sont actifs sur les trois bactéries-test *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*. Les fractions 1 et 3 qui ont respectivement le rf 0.56 et 0.89 ont montré une activité inhibitrice contre *Listeria monocytogenes* alors que pour *P.aeruginosa* seule la fraction 3 (0.89) a présenté un pouvoir inhibiteur important.

Mots clés : Myxobactéries, Molécule bioactifs, Activité antibactérienne

Abstract:

The myxobacteria which are Gram negative bacteria belong to the proteobacteria group are considered as an excellent source of bioactive metabolites. In the present work we are interested in the research of these microorganisms in different natural biotopes of Algeria. Samples are collected from two sites for marine sediments and three rhizospheric soils of the three plants Ziziphus, Artemisia, Pistacia lentiscous. Isolation is performed using four methods, the first two methods aim to search for cellulolytic Myxobacteria (filter paper method and rabbit dung method) while the other two aim to select micropredators of this bacterial group live and dead *Escherichia coli*. Marine sediments were found to be the richest in myxobacteria. A total of 19 myxobacterial isolates are obtained from different samples and by different methods. The primary screening is performed by the agar cylinder technique against five indicator bacteria (*E coli*, *Pseudomonas Staphylococcus aureus MRSA*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*). Six isolates or 31% out of 19 gave antibacterial activity. Based on the spectrum of activity, two isolates S16s MI and S27s MIV were selected for fermentation on CY medium. The preliminary characterization of the crude extract by CCM allowed us to select the proportion of adequate solvents of the mobile phase, it is ethyl acetate / methanol (9/1). This technique allowed to separate the extract in three fractions. The secondary screening by the well method showed that both extracts are active on the three test bacteria *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*. Fractions 1 and 3 which have respectively rf 0.56 and 0.89 showed an inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* while for *Pseudomonas aeruginosa* only fraction 3 (0.89) showed a significant inhibitory power.

Keywords: Myxobacteria, Bioactive molecule, Antibacterial activity

المخلص:

تنتمي البكتيريا المخاطية سالبة الجرام إلى مجموعة البكتيريا البروتينية وتعتبر مصدرا ممتازا للمستقلبات النشطة بيولوجيا. في هذا العمل كنا مهتمين بالبحث عن هذه الكائنات الحية الدقيقة في مختلف البيئات الحيوية الطبيعية في الجزائر. تؤخذ عينات من موقعين للرواسب البحرية وثلاثة تربة جذرية من النباتات الثلاثة زيزيفوس ، أرتميسيا ، بيستاسيا لينتيسكوس. يتم إجراء العزل باستخدام أربع طرق، تهدف الأوليان إلى البحث عن البكتيريا المخاطية المحللة للسيلولوس (طريقة ورق الترشيح وطريقة سماد الأرانج) بينما تهدف الاثنتان الأخريان إلى اختيار الحيوانات المفترسة الدقيقة لهذه المجموعة البكتيرية الإشريكية القولونية الحية والميتة. الرواسب البحرية هي الأغنى في البكتيريا المخاطية. يتم الحصول على ما مجموعه 19 عزلة ملغمية من عينات وطرق مختلفة. يتم إجراء الفحص الأولي بواسطة تقنية أسطوانات الأجار ضد خمسة بكتيريا مؤشرة (*E.coli* ، *Pseudomonas* *Staphylococcus aureus* *Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* *MRSA*). أعطت ستة عزلات 31٪ من أصل 19 نشاطا مضادا للجراثيم. استنادا إلى طيف النشاط، يتم اختيار عزلين S16s MI و S27s MIV لإجراء التخمر على وسط CY. سمح لنا التوصيف الأولي للمستخلص الخام بواسطة CCM باختيار نسبة المذيبات المناسبة للمرحلة المتنقلة، وهي خلاص الإيثيل / الميثانول (1/9). جعلت هذه التقنية من الممكن فصل المستخلص إلى ثلاثة كسور. أظهر الفحص الثانوي بواسطة طريقة البئر أن كلا المستخلصين نشطان على بكتيريا الاختبار الثلاثة *Bacillus subtilis* و *Listeria monocytogenes* و *Pseudomonas aeruginosa*. أظهرت الأجزاء 1 و 3 اللتان لهما على التوالي rf 0.56 و 0.89 نشاطا مثبطا ضد الليستيريا *monocytogenes* بينما بالنسبة ل *P.aeruginosa* فقط أظهر الجزء 3 (0.89) قوة تثبيط كبيرة.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المخاطية، جزيء نشط بيولوجيا، نشاط مضاد للبكتيريا.

Table de matière

PARTI I. INTRODUCTION

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

PARTIE II. BIOLOGIE DES MYXOBACTERIES

II.1.Historique.....	04
II.2. Habitats.....	05
II.3. morphologie et structure.....	06
II.3.1. Cellules végétatives.....	06
II.3.2. Les fructifications.....	06
II.3.3. Les myxospores.....	06
II.3.4. Le génome.....	06
II.4. La motilité.....	07
II.5. La taxonomie.....	08
II.6. CYCLE DE VIE	08
II.6.A. La croissance végétative	10
II.6.B. Cycle de développement	10
II.7. La physiologie, nutrition et prédation des Myxobactéries	11
II.8. Les myxobactéries marines	12

PARTIE III. METABOLISME SECONDAIRE DES MYXOBACTERIES

III.1. Génétique et potentiel biosynthétique	14
III.2. La Biosynthèse des métabolites secondaires	14
III.3. Les métabolites secondaires	15
III.4. L'intérêt	19

PARTIE IV. MATERIEL ET METHODES

IV.1. Objectif	21
IV.2. L'échantillonnage	22
IV.2.1. La collecte	22
IV.3. Les traitements des échantillons	23
IV.3.1. Le séchage	23
IV.3.2. Le tamisage	23

IV.4. L'isolement des myxobactéries	23
IV.4.1. L'isolement des myxobactéries cellulolytiques	23
IV.4.1.1. Méthode de papier filtre	23
IV.4.1.2. Méthode de Fumier de lapin	24
IV.4.2. L'isolement des myxobactéries micro-prédateurs	25
IV.4.2.1. Méthode de proie bactérienne	25
IV.4.2.1.1. <i>E. coli</i> vivante.....	25
IV.4.2.1.2. <i>E. coli</i> morte	25
IV.5. La purification.....	27
IV.5.1. La vérification de la pureté des souches	27
IV.6. La mise en évidence de l'activité antagoniste.....	27
IV.6.1. Le Test de l'activité biologique.....	28
IV.6.1.1. Confirmation de l'identité des souches cibles.....	28
IV.6.1.2. La préparation de l'inoculum.....	28
IV.6.1.3. Méthode des cylindres d'agar.....	28
IV.7. Production de métabolites secondaire.....	28
IV.7.1 Fermentation et extraction	28
IV.7.1.1 La fermentation	28
IV.7.1.2. L'extraction.....	29
IV.8. Test d'activité antimicrobienne des extraits	30
IV.9. La mise au point de la chromatographie sur couche mince CCM.....	31
IV.9.1. Le choix du meilleur système de solvant pour la séparation	31
IV.9.2 L'extraction des trois molécules séparées par la CCM.....	31
IV.9.3 Le test d'activité antimicrobienne des molécules extraites.....	32
IV.10. Conservation des souches Myxobactériennes.....	32
IV.10.1. Longue durée	32
PARTIE V. RESULTATS ET DISCUSSION	
V.1. Les résultats d'isolement des myxobactéries cellulolytiques	34
V.1.1. La méthode de papier filtre	34
V.1.2. La méthode de fumier de lapin	34
V.2. Les résultats d'isolement des Myxobactéries bactériolytiques	35

V.2.1. Méthode d' <i>E. coli</i> vivante.....	35
V.2.2. La méthode d' <i>E.coli</i> morte.....	35
V.3. Les résultats et interprétation d'isolement	36
V.4. Caractères morphologiques.....	37
V.4.1. Corps de fructification	37
V.4.2. Colonie sur milieu solide	37
V.4.3. Aspect microscopique	38
V.5. Purification des isolats de myxobactéries	39
V.6. Confirmation des souches cibles.....	39
V.7. L'activité antibactérienne des isolats myxobactériennes contre les souches indicatrices (Technique de cylindres d'agar).....	40
V.7.1. Technique de cylindres d'agar	40
V.8. Test d'activité antimicrobienne des extraits.....	40
V.9. La chromatographie sur couche mince (CCM).....	45
V.10. Teste des extraits des molécules.....	47
VI. Conclusion.....	49
VII. Résumé.....
V.III. Références bibliographique.....
Annexe.....

I. INTRODUCTION

Introduction

I. INTRODUCTION

La résistance aux antibiotiques s'est progressivement développée et concerne aujourd'hui l'ensemble des bactéries pathogènes. Elle résulte de l'administration répétée d'antibiotiques chez l'homme ou l'animal qui crée des conditions, appelées « Une pression de sélection » favorisant l'acquisition et la dissémination de souches résistantes aux antibiotiques.

Aujourd'hui, les nouvelles molécules sont rares et il n'est parfois plus possible, difficile, voire impossible de traiter certaines infections s'ajoute à cela le développement de maladies chroniques cardiovasculaires, neuronales, cancéreuses et auto-immunes qui ont mis en évidence une urgence et incité les scientifiques à mener des recherches pour découvrir de nouvelles substances biologiquement actives.

Les métabolites secondaires synthétisés par les producteurs naturels sont à l'origine d'environ 40 % des médicaments humains dont 50 % sont des bactéries et des champignons (**Demain 1999**)

En plus de *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Actinomyces*, les myxobactéries sont des alternatives prometteuses pour produire des métabolites secondaires avec des modes d'action inhabituels sur un large spectre de cellules eucaryotes et procaryotes (**Reichenbach 2001 ; Garcia et al., 2009**).

Ces bactéries à Gram négatif appartenant à la classe des Delta protéobactéries présentent des caractéristiques uniques telles que la formation de fructifications sporulées et la motilité glissante; les deux processus sont contrôlés par la communication intercellulaire (**Dworkin 1984 ; Garcia et al., 2009**). Une autre caractéristique importante est qu'il s'agit de petits carnivores qui se nourrissent d'autres micro-organismes (bactéries, levures, etc.) grâce à des enzymes (polysaccharases, lipases, protéases, nucléases...) aussi bien qu'à des métabolites bioactifs qui sont à l'origine de leur grand intérêt (**Rosenberg et Varon., 1984 ; Karamanos et al., 1999 ; Garcia et al., 2009**).

Selon **Garcia et al (2009)**, en ciblant des environnements isolés ou inexplorés dans les tropiques et subtropicaux, des souches rares ou complètement nouvelles peuvent être découvertes, "le climat chaud de ces régions peut favoriser la diversité des myxobactéries, donc de nouvelles souches semblent être très peut découvert. Ces zones abritent une grande diversité d'espèces myxobactériennes (**Dawid 2000**).

Très peu de laboratoires dans le monde se concentrent sur l'exploration de la diversité des myxobactéries et malheureusement, l'étude des myxobactéries n'a pas attiré l'attention des microbiologistes algériens bien que ces bactéries soient distribuées dans le monde entier et dans différents environnements, le sol est la source la plus commune d'isolement.

Introduction

Par conséquent, afin d'étudier de nouvelles substances bioactives, ce travail vise à isoler les souches de Myxobactéries de différents biotopes naturels de l'Algérie ainsi qu'à évaluer leurs activités antibactérienne.

II. Biologie des myxobactéries

II.1.Historique

En 1809, le botaniste allemand Heinrich Friederich Link a rapporté ses observations sur les fructifications myxobactériennes de *Polyangium vitellinum* et les a décrites comme "gasteromycete" membre des champignons Basidiomycota (**Link 1809**), deux autres espèces, *Stigmatella aurantiaca* et *Chondromyces crocatus* ont été décrites 48 ans plus tard (**Berkeley 1857**). Elles ont été classées comme hyphomycètes, un champignon imperfecti. On a continué à les confondre avec des champignons jusqu'à ce qu'un botaniste des États-Unis, Roland Thaxter, les présente comme des myxobactéries en 1892 (**Thaxter 1892**). Il a fallu une vingtaine d'années pour que les travaux de Thaxter soient largement acceptés. Jusqu'en 2006, il existait environ 50 espèces de myxobactéries qui étaient regroupées en 3 sous-ordres, 6 familles et 17 genres (**Shimkets et al. 2006**).

Les myxobactéries sont des bactéries Gram négatif que l'on trouve principalement dans les habitats terrestres, comme le sol, les matières végétales en décomposition et l'écorce des arbres vivants ou morts. Cependant, certains rapports ont révélé que les myxobactéries peuvent également être isolées d'échantillons marins (**Zhang et al. 2005 ; Brinkhoff et al. 2012**).

Parmi les myxobactéries collectées, celles provenant d'échantillons marins étaient nouvelles notamment *Haliangium ochraceum*, *H. tepidum* (**Fudou et al. 2002**), *Enhygromyxa salina* (**Iizuka et al. 2003a**), *Plesiocystis pacifica* (**Iizuka et al. 2003b**) et *Pseudenhygromyxa salsuginis* (**Iizuka et al. 2013**).

Les myxobactéries en général sont caractérisées par leur capacité à former des fructifications et leur mobilité glissante sur une surface solide, les fructifications sont formées après épuisement de l'approvisionnement en nourriture et contiennent des myxospores résistantes à la sécheresse. Les colonies peuvent se propager dans une zone inoccupée, ce mouvement de propagation est appelé comportement d'essaimage. La forme, la taille, la couleur ou la disposition des cellules végétatives, des essaims, des fructifications et des myxospores sont importantes pour déterminer le genre des myxobactéries. Contrairement à la plupart des bactéries, les myxobactéries sont également capables de lyser les cellules vivantes. Pour cette raison, elles sont appelées prédateurs. Sur la base de la spécialisation des myxobactéries dans la dégradation des biomacro-molécules, elles sont divisées en myxobactéries bactériolytiques qui lysent les cellules entières d'autres micro-organismes et en myxobactéries cellulolytiques qui décomposent efficacement la cellulose au lieu des cellules vivantes (**Singh 1947 ; Hou et al. 2006**). Les myxobactéries sont connues pour leur énorme potentiel de production de métabolites secondaires aux activités biologiques variées. Pour certaines raisons, leurs utilisations en tant que producteur potentiel de métabolites secondaires est limitée. Elles sont relativement difficiles à isoler et à purifier.

II.2. Habitats

Les principaux habitats des myxobactéries sont le sol, les excréments, les matières végétales en décomposition comme l'écorce des arbres vivants ou morts. En outre, on les trouve parfois dans des endroits où probablement elle ne peut pas vivre, mais où leurs stades de repos leur permet de survivre pendant un certain temps. Ainsi, plusieurs espèces de myxobactéries ont été isolées à partir de sédiments de bord de mer (**Brockman, 1967 ; Menne, B., 1988**). Bien qu'aucune myxobactérie n'est connue d'être capable de se développer à la concentration de sel trouvée dans l'eau de mer, typiquement, dans les échantillons avec une teneur élevée en sel, comme les marais salants ou certains sols désertiques, les myxobactéries ne peuvent être mise en évidence que si l'échantillon est d'abord dessalé avant d'être cultivé sur un milieu faiblement salé (**Ruckert, 1983**).

La présence des myxobactéries dans la tourbe de sphagnum à un pH de 3,7 et d'une faible teneur en oxygène de 2,6 mg/litre est également remarquable (**Dawid, 1984**), parce que, dans les cultures les myxobactéries sont des aérobies stricts et sans exception et ne se développent pas à un pH inférieur à 5,5. Bien sûr dans les habitats complexes, l'existence d'homogénéité entre les microniches est toujours concevable et pourrait expliquer la présence de myxobactéries dans des conditions apparemment inacceptables.

Un autre habitat particulier est la surface des feuilles ou phyllosphère des plantes (**Ruckert, 1981**), aucune feuille n'a été échantillonnée plus haut que 2 m au-dessus du sol, mais toutes les 14 espèces de plantes investiguées et 52% des spécimens étaient positifs, principalement pour les espèces de *Myxococcus*. Encore une fois, il n'y a rien qui prouve que les myxobactéries peuvent vraiment se développer sur les feuilles des plantes bien que cela ne soit pas totalement inconcevable. Leur présence dans les cavernes (**Menne et Ruckert, 1988**) peut sembler moins étonnante parce que les organismes pourraient facilement se développer ou rester en sommeil, en fonction des conditions locales.

Les myxobactéries sont très communes dans les sols de pH neutre ou légèrement alcalin (**Dawid, 1978, 1979 ; Hook, 1977; Ruckert et Heym, 1977**)

Elles ont été isolées à partir d'échantillons prélevés dans les forêts tropicales et dans la toundra arctique, dans les steppes, les déserts, les tourbières, au niveau de la mer aussi bien qu'en hautes altitudes zones chaudes et sèches.

Comme nous l'avons souligné dans la section "Habitats", la fréquence des myxobactéries sur un substrat spécifique peut varier de façon substantielle dans différents environnements.

De plus, certaines espèces peuvent être sous-représentées à partir d'une certaine source parce que la technique d'isolation habituellement appliquée ne peut pas donner les résultats escomptés. La technique d'isolement habituellement appliquée peut ne pas aboutir à l'isolement de l'organisme

en question. La fréquence des espèces rencontrées s'évalue comme suite: 5 : omniprésent ; 4 : très fréquent ; 3 : moyennement fréquent ; 2 : relativement rare ; 1 : rare.

II.3. morphologie et structure

II.3.1. Cellules végétatives

Les myxobactéries sont des bactéries non flagellées Gram négatif avec une plage de mesure de 0,6-1,2 X 3-15 μm en formant des colonies avec un aspect caractéristique d'essaimage ou d'essaim. Leur cycle de vie est caractérisé par la formation de fructifications, et Myxospores (**Dworkin 1966; Reichenbach 2005**).

II.3.2. Les fructifications

Sont des structures naturelles très spécifiques, Se présentant sous différentes formes, couleurs et consistances (Figure 2). Leur taille est comprise entre 10 et 700 μm de diamètre et peut être observé au stéréo-microscope (**White 1984**). À l'intérieur dans des conditions de mal nutrition les myxobactéries réalisent un plan de développement coopératif impliquant des centaines de milliers de cellules sous forme visqueuse de type *Pseudoplasmodium* qui se transforme en complexes multicellulaires (**Findlay 2016**).

Dans ces corps, la plupart des cellules végétatives meurent et servent de nourriture aux cellules restantes, qui se transforment en myxospores résistantes (**Shimkets et al., 2006**).

II.3.3. Les myxospores

Sont appelées mycrocytes pendant un certain temps, le degré de la différenciation morphologique entre cellule végétative et myxospores varie considérablement avec les différents genres des myxobactéries. Dans tous les cas, les cellules végétatives se convertissent progressivement en myxospores, souvent elles sont incluses dans des structures fermées appelées sporangioles ou sporanges. Les myxospores peuvent survivre jusqu'à 10 ans (**White 1984**).

II.3.4. Le génome

Au cours des dix dernières années, vingt-cinq génomes myxobactériens sont devenus disponibles (**base de données NCBI, janvier 2016**). A l'exception de la famille *Anaeromyxobacteraceae*, dont les membres ne forment pas d'organes et ont des génomes d'environ 5 Mb, le reste des espèces forment des organes fructifères et possèdent les plus grands génomes décrits parmi les procaryotes, allant de 9 à 14,8 Mb.

Puisque les myxobactéries présentent des comportements multicellulaires, il est tentant de spéculer que leur grands génomes et grands protéomes sont nécessaires pour leur mode de vie particulier.

II.4. La motilité

Les myxobactéries se déplacent sur les surfaces en utilisant deux formes de motilité complémentaires indépendantes de flagelles (Figure 3A), la motilité A et la motilité S.

Les deux systèmes de motilité coordonnés dans l'espace et dans le temps, facilitent non seulement le mouvement de surface des cellules individuelles mais sont également essentiels pour l'expansion des essaims multicellulaires. La prédation et la construction de fructifications multicellulaires (Nan et Zusman, 2011).

- La motilité A, ou motilité de glissement, entraîne le mouvement des cellules individuelles sur les bords de l'essaim, les cellules à motilité A glissent lentement pour explorer de nouveaux environnements et changent de direction par des événements d'inversion et laissent derrière elles des traces de bave ECM qui peuvent être suivies par d'autres cellules (Figure 3B). Le mécanisme précis de la motilité A n'est pas complètement connu.

-La motilité S, ou motilité par secousses, est caractérisée par le mouvement d'essaimage de grands groupes de cellules, elle est stimulée par la proximité cellule-cellule. Cette motilité est cruciale pour la formation des fructifications (Shimkets, 1986a, b) et la prédation coopérative (Pérez et al., 2014).

II.5. La taxonomie

La position phylogénétique des myxobactéries a été élucidée par une comparaison des séquences ARNr 16S (Ludwig et al., 1983 ; Oyaizu et Woese, 1985). D'après ces données, les myxobactéries appartiennent à la branche delta de la grande assemblée qui a été appelée les bactéries pourpres ou les proteobactéries. La branche delta contient également le genre lointainement apparenté *Bdellovibrio* et certains réducteurs de sulfate tels que les genres *Desulfovibrio* et *Desulfonema* (Stackebrandt et al., 1988). Actuellement l'ordre monophylétique *Myxococcales* comprend 3 sous-ordres, 10 familles, 29 genres, et 58 espèces. (Mohr 2018).

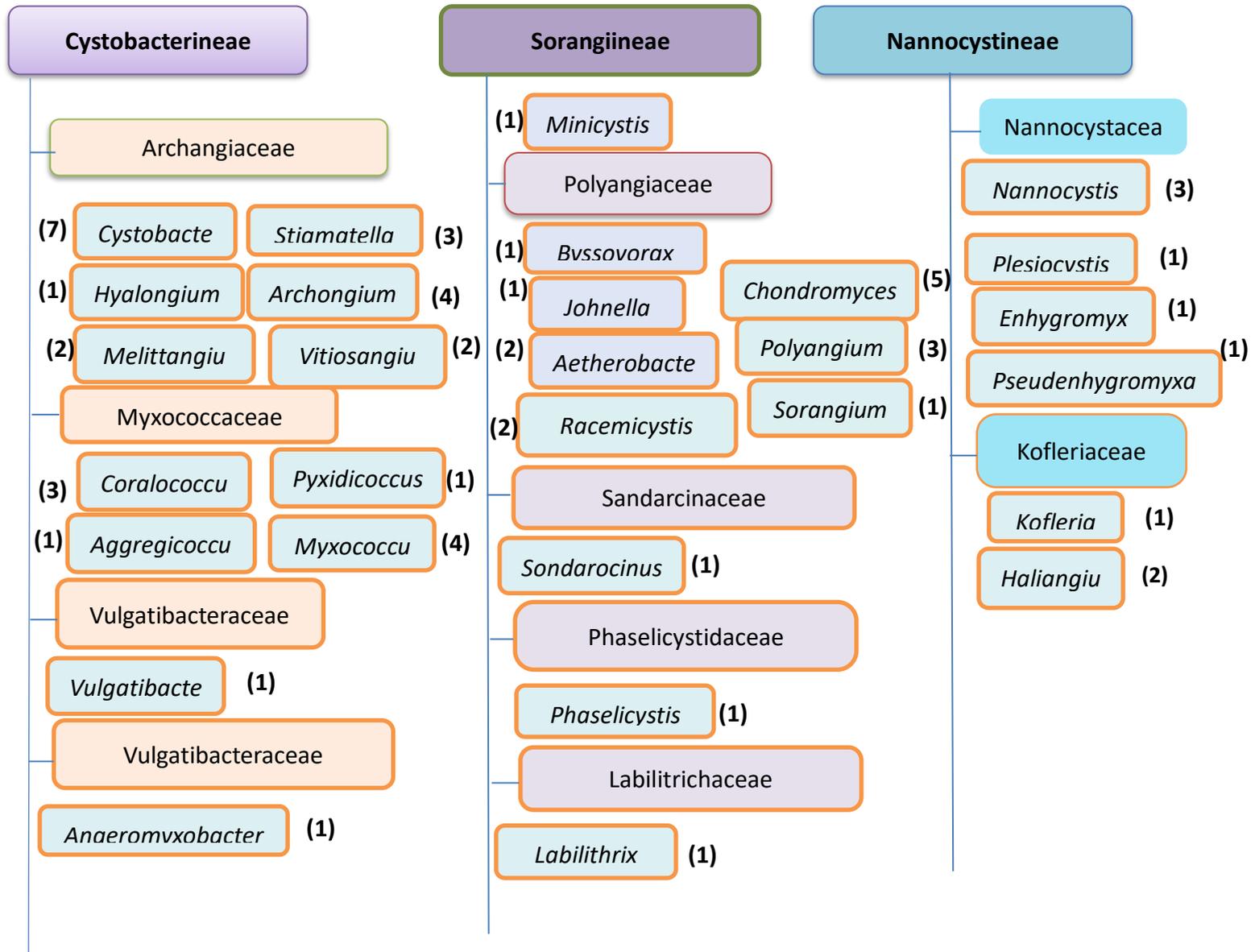


Figure 1 : Taxonomie actuelle de l'ordre des *Myxococcale* (Mohr 2018).

II.6. CYCLE DE VIE

En présence de nutriments, les cellules se déplacent de manière coordonnée, formant des biofilms multicellulaires appelés essaims.

Lorsque les essaims entrent en contact avec une proie, des milliers de cellules finissent par pénétrer dans la colonie de la proie et lysent les cellules (Figure 3A) (Berleman et Kirby, 2009 ; Pérez et al., 2016).

Cette stratégie de prédation de groupe favorise l'hydrolyse par l'essaim des bio-polymères

Biologie des myxobactéries

extracellulaires en utilisant des exo-enzymes communes ceci est l'utilisation la plus efficace possible des sources de nutrition disponibles.

Cependant, en cas de famine, les cellules en mouvement collectif entament un processus de développement et échangent des signaux chimiques extracellulaires ainsi que des signaux de contact physique pour former des fructifications verticales de quelques millimètres de long (**Kaiser, 2004 ; Mauriello et al., 2010**).

Ces structures multicellulaires matures (Figure 3B), remplies de myxospores résistantes à l'environnement (**O'Connor et Zusman, 1991a**), sont entourées de deux sous-populations différentes montrant une division du travail (Figure 3B) : Une monocouche de bâtonnets périphériques alignés qui se distinguent des cellules végétatives et des spores (**O'Connor et Zusman, 1991b**), et des cellules qui subissent une autolyse obligatoire altruiste par le biais d'une mort cellulaire programmée (**PCD ; Wireman et Dworkin, 1977; Nariya et Inouye, 2008**).

Dans les fructifications les myxospores sont fermement liées entre elles. Ainsi lors de la germination, la population entière reste ensemble pour créer une nouvelle communauté.

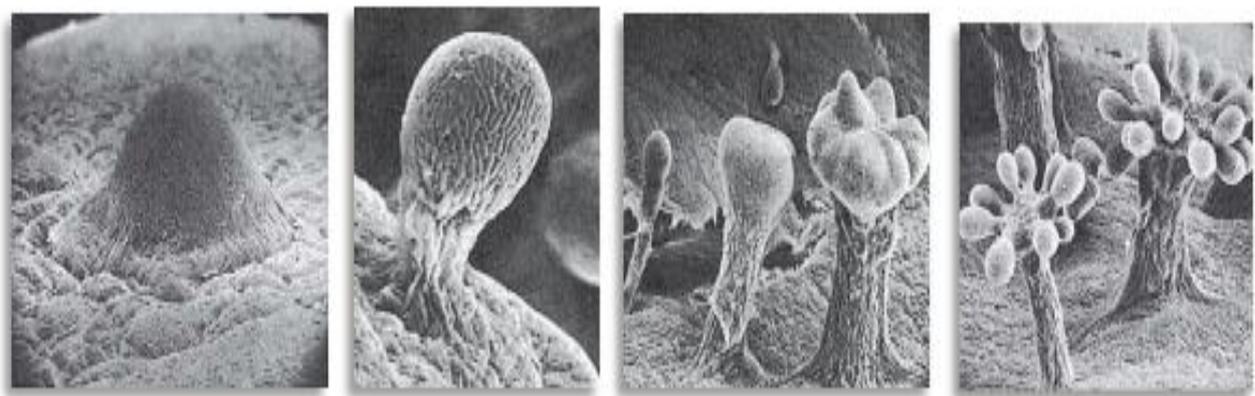


Figure 2 : Micrographies électroniques à balayage de formation de corps fructifiés chez *Chondromyces crocatus*, la structure finale mesure 600µm d'hauteur (**Madigan et al.,2015**).

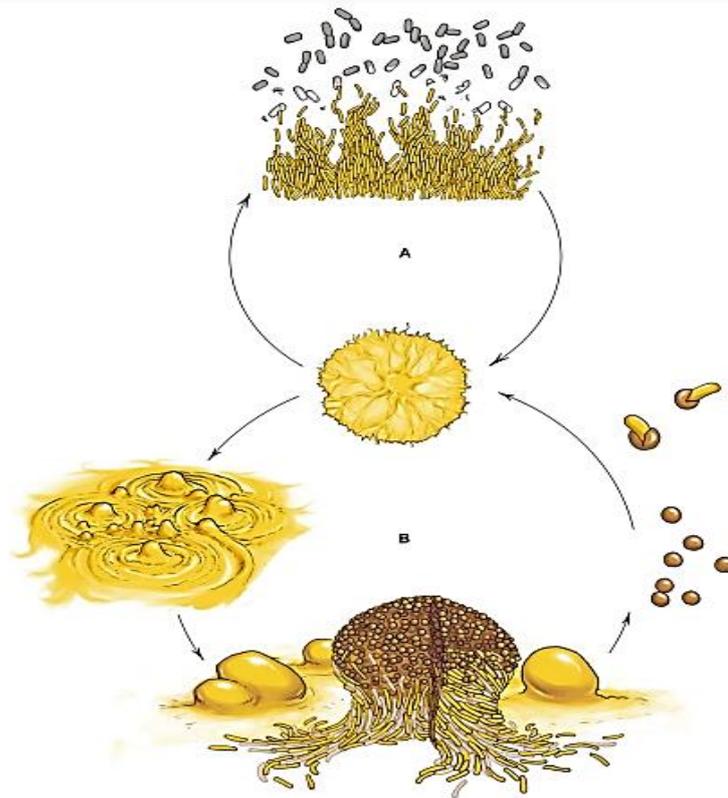


Figure 3 : cycle de vie de la bactérie *Myxococcus xanthus*.

II.6.A. La croissance végétative

En présence de nutriments, les cellules se déplacent de manière coordonnée, formant des essaims. Lorsque les essaims entrent en contact avec une proie, les cellules pénètrent dans la colonie de la proie et lysent les cellules.

II.6.B. Cycle de développement

Lors de la famine, les cellules se déplaçant collectivement initient un programme de développement et échangent des signaux extracellulaires ainsi que des signaux de contact physique pour d'abord former des agrégats et ensuite construire des fructifications verticales de quelques millimètres de long remplies de cellules différenciées reproductives et résistantes à l'environnement, appelées myxospores (cellules rondes), entourées de deux sous-populations présentant une division des cellules. Ces sous-populations montrent une division du travail : une monocouche de bâtonnets périphériques alignés non reproductifs (cellules bâtonnets jaunes) et des cellules qui subissent une autolyse obligatoire altruiste par mort cellulaire programmée (cellules en bâtonnets marron clair). Les myxospores assurent la survie pendant la famine ou la dessiccation et peuvent être dispersées dans d'autres environnements et germer lorsque les conditions nutritives s'améliorent.

II.7. La physiologie, nutrition et prédation des Myxobactéries

Les myxobactéries sont des organismes organotrophes et mésophiles strictement aérobies. Ils se propagent entre 9–38°C. Leur temps de génération est compris entre 4 et 12 h (**BaurE.1905**), elles ont besoin de Ca^{+2} et de concentration élevée en Mg^{+2} , certaines souches peuvent se développer avec la présence de 0.8% de Na Cl (**Reichenbach 1984; Shimkets et al.,2006**). Toutes les myxobactéries se caractérisent par leur capacité à dégrader les macromolécules biologiques.

En ce qui concerne l'utilisation de la cellulose, ils forment deux groupes en fonction de leur capacité à utiliser des composés azotés inorganiques.

- Le groupe I (dégradeurs de cellulose, sous-ordre *Sorangineae*) : Il est capable d'utiliser des composés azotés inorganiques tout en se développant sur de la cellulose et du glucose. La formation de cellulase est supprimée par des teneurs en sucre plus élevées (**Reichenbach, H. and Dworkin, M. 1991**), (**Couke P .Voets J.P. 1967**).

- Le groupe II : Il représente la majorité des espèces myxobactériennes, incapables d'utiliser la cellulose. En ce qui concerne l'azote, ils dépendent de substrats de croissance contenant des acides aminés (peptones) qui sont fournis par la dégradation enzymatique de protéines sous forme d'oligopeptides ou d'acides aminés simples.

Dans les conditions naturelles de l'environnement, ces myxobactéries se nourrissent d'autres organismes tels que les eubactéries ou les levures par bactériolyse ou lyse cellulaire, les exoenzymes excrétées (protéases, nucléases, lipases, glucanases) détruisent les cellules vivantes intactes, d'autres exoenzymes hydrolysent l'amidon, le xylane et la chitine. Le lysat nutritif ainsi formé est la base nutritionnelle de ces myxobactéries, qui ont donc été appelées microprédateurs (**Reichenbach, H. and Dworkin, M. 91**), (**Singh B.N.1947**), (**Reichenbach, H. 1993**).

La capacité bactériolytique des myxobactéries est mise à profit lors de l'enrichissement et de l'isolement à partir du sol et des crottes d'animaux phytophages. En tant que microbes aérobies, les myxobactéries possèdent des enzymes respiratoires (Cytochromes), la NADH oxydase et un cycle complet d'acide tricarboxylique (**L.J. 1984**), (**Reichenbach, H. and Dworkin, M. 1991**). Malgré leurs activités cellulolytiques et bactériolytiques, les myxobactéries sont sensibles aux antibiotiques en étant sensibles à l'érythromycine, la néomycine, la kanamycine, la streptomycine et la tétracycline (**McCurdy H.D., 1969**), (**Reichenbach, H. and Dworkin, M. 1991**). Plutôt inhabituel pour les bactéries Gram-négatives, presque toutes les myxobactéries sont sensibles à l'actinomycine. D'après Dowkin (**Dworkin M. 1969**), cela est dû à la surface cellulaire fortement lipophile.

II.8. Les myxobactéries marines

Les myxobactéries marines sont considérées comme excellente source de nouveaux composés avec diversité chimique exceptionnelle (Garcia et al.,2018) car les extraits des espèces récemment découvertes ont fourni des échafaudages différents de ceux obtenus à partir des myxobactéries du sol.

A ce jour, huit familles de base de métabolites secondaires dont l'haliangicine (Lizuka et al., 2013), l'haliamide (Sun et al., 2016), les miuraénamides (Lizuka et al., 2013), les phénylnannolones (Ohlendorf et al., 2008), le salimabromide (Felder et al., 2013), les enhygrolides, les salimyxines (Felder et al., 2013 et Tomura et al., 2017) et l'acide enhygromique (Tomura et al., 2017) ont été isolés à partir de myxobactéries tolérantes ou obligatoires au sel.

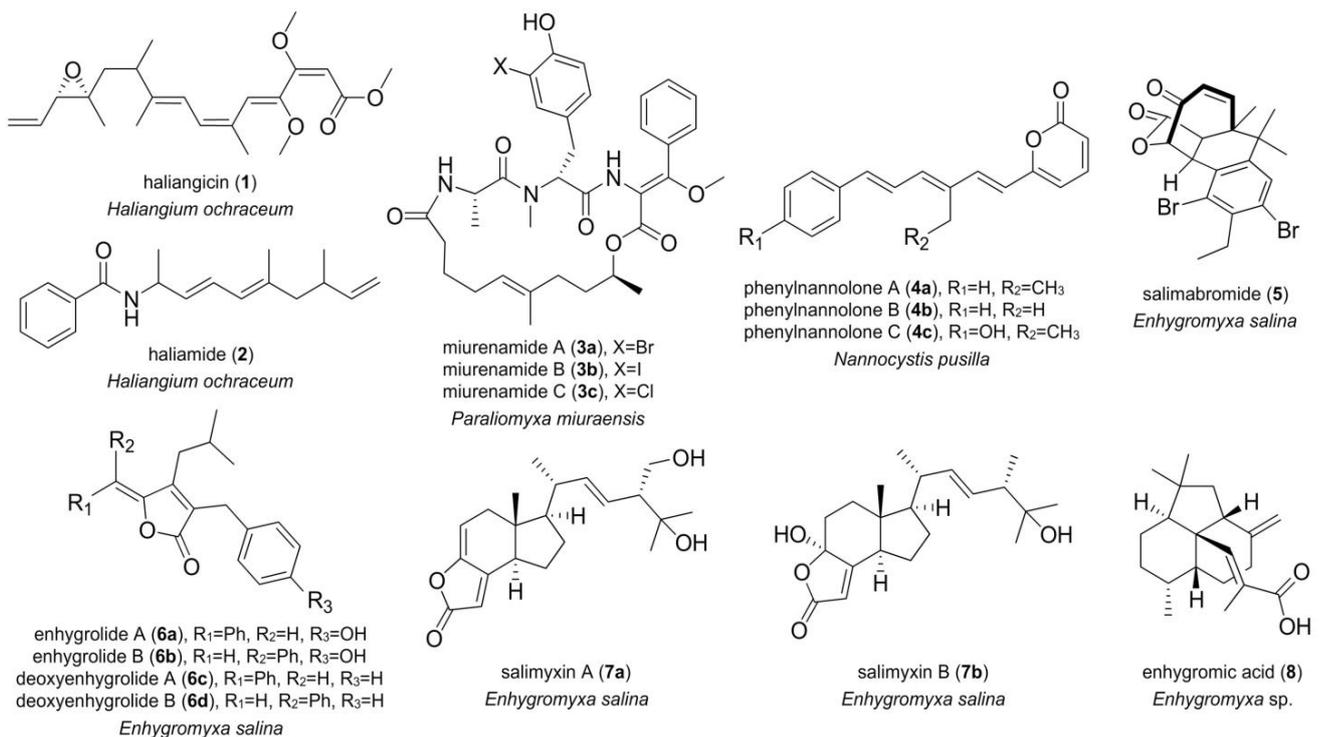


Figure 4: Une sélection de produits naturels isolés à partir d'extraits de myxobactéries marines.

III. Métabolisme secondaire des Myxobactéries

Au cours de la dernière décennie, un grand nombre de groupes de gènes biosynthétiques ont été identifiés. Cette information génétique permet de prédire des voies inconnues et par la suite de nouvelles structures. (**H. G. Menzella et al., 2007** et **B. Shen et al., 2004**), les myxobactéries ont apparié les champignons, actinomycètes ainsi que certaines espèces du genre *Bacillus* en tant que principaux producteurs de métabolites microbiens secondaires signalés par (**Weissman et Muller.,2010**). Les myxobactéries représentent une riche source de bioactifs métabolites secondaires. Le rôle de ces derniers est d'assurer la survie dans les environnements hautement compétitifs riche en matière organique et en vie microbienne, et aussi de moduler l'interaction cellulaire avec les communautés de sol (**Weissman et Muller.,2009**).

Environ cent (100) structures de base et cinq cent (500) dérivés produites par sept mille cinq cent (7500) souches sont identifiées (**Weissman et Muller.,2010**). Plusieurs de ces dérivés montrent des activités : cytotoxique, immunosuppressive, antibactérienne, antifongique antivirale et même antimalaria (**Mohr 2018**).

III.1. Génétique et potentiel biosynthétique

Avec plus de 8,5 % du génome dédié au métabolisme secondaire myxobactériens, le potentiel biosynthétique est important et prometteur, 50 à 100 % de souches produisent des composés bioactifs (**Dawid 2000; Weissman et Muller.,2009**), alors le rendement dans des conditions standards de laboratoire ne reflétait pas le véritable potentiel génétique. La capacité réelle de biosynthèse est plus élevée que celle suggéré par la fermentation (**Weissman et Muller.,2010**).

Le génome de *M. xanthus* l'organisme modèle de myxobactéries comporte dix huit (18) clusters de gènes biosynthétiques différents, la plupart sont de PKS, NRPS et systèmes hybrides (**Goldmen et al.,2006**). La densité de gènes biosynthétique des myxobactéries prédatrices est plus élevé qu'au non prédatrices (**Korp et al.,2016**).

III.2. La Biosynthèse des métabolites secondaires

En générale, les myxobactéries produisent des polykétides PK, des peptides non ribosomiques NRP et des hybrides PK / NRP, mais la production de stéroïdes rares chez les procaryotes a récemment été détectée. Ces composés proviennent d'un processus de biosynthèse en plusieurs étapes dû à la voie non ribosomale, mais d'autres métabolites produits via la voie ribosomale ont été mis en évidence pour la première fois par **Revermann (Wenzel et Muller.,2007; Revermann 2012)**.

Au cours de la biosynthèse assurée par les méga-synthases PKS, NRPS ou système Hybrides, utilisant des blocs de construction simples tels que les acides tricarboxyliques, la coenzyme A et les

acides aminés sont essentiels à l'assemblage des métabolites.

Les méga-enzymes sont composées de modules fonctionnels composés de domaines interconnectés. Parmi eux, ce dernier assure les étapes d'activation et de sélection Monomère, liaison covalente au substrat, allongement et libération de chaîne.

Habituellement, chaque module est responsable de l'incorporation d'un bloc de construction. Dans la chaîne de croissance du produit, en effet des modifications post synthétiques sont nécessaires pour l'activer (**Wenzel et Muller., 2007**).

III.3. Les métabolites secondaires

À ce jour, soixante-sept (67) classes de substances différentes des myxobactéries ont été publiées, mais preuve de plus de cent (100) structures de base. Comme beaucoup d'entre eux ont d'autres dérivés, il existe plus de cinq cent (500) substances connues. (**Garcia et al.,2009**)

Plusieurs échafaudages différents de NP peuvent être produits par les myxobactéries, certains uniques et d'autres déjà connus par d'autres bactéries.

La diversité structurale varie des polycétacés (PK), des peptides non ribosomiaux (NRPs), et leurs hybrides, aux alcaloïdes, aux terpénoïdes et aux phénylpropanoïdes. (**Weissman et Müller., 2010**)

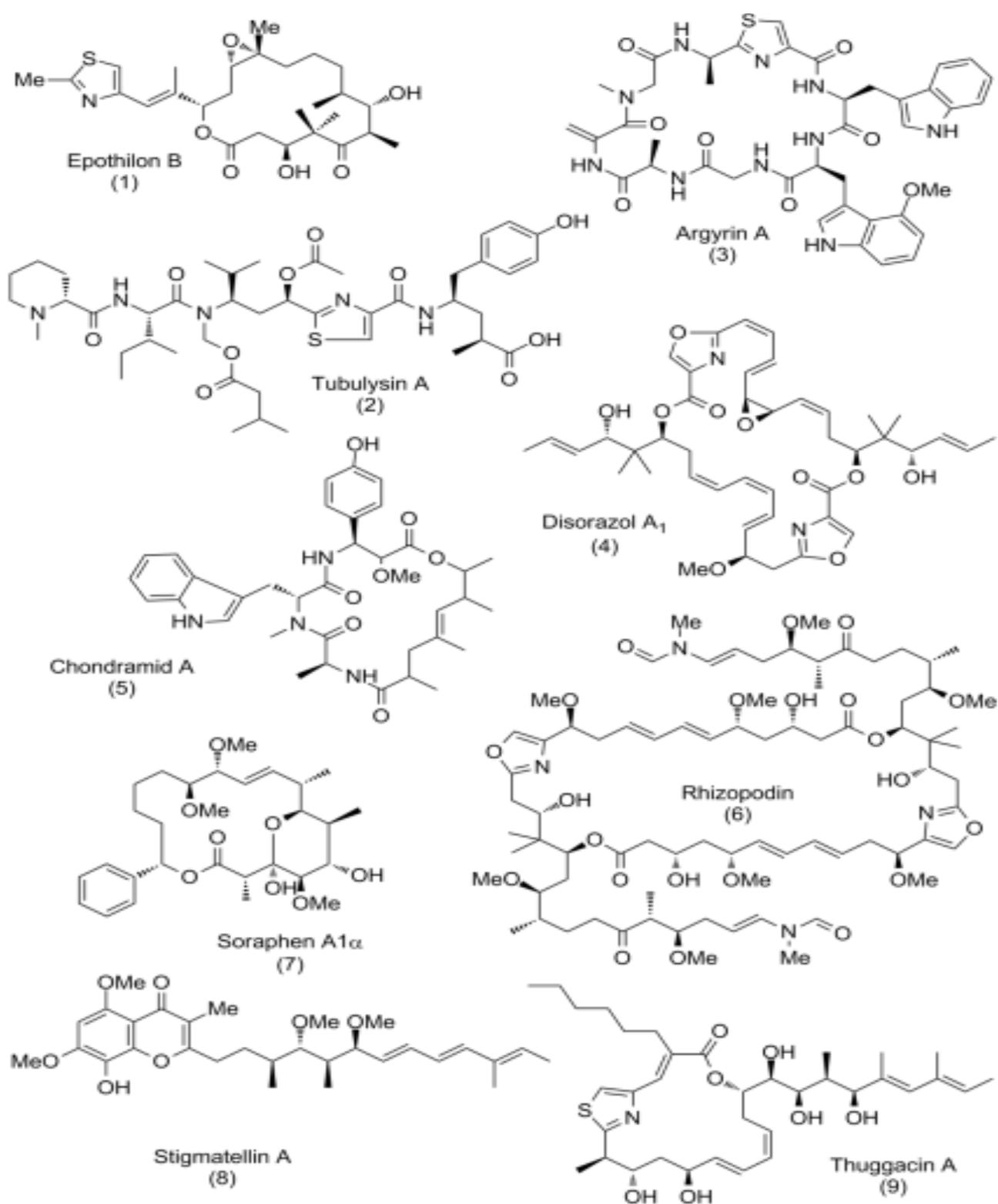


Figure 5 : Structures chimiques de certains métabolites Myxobactériens bioactifs
(Garcia et al., 2009).

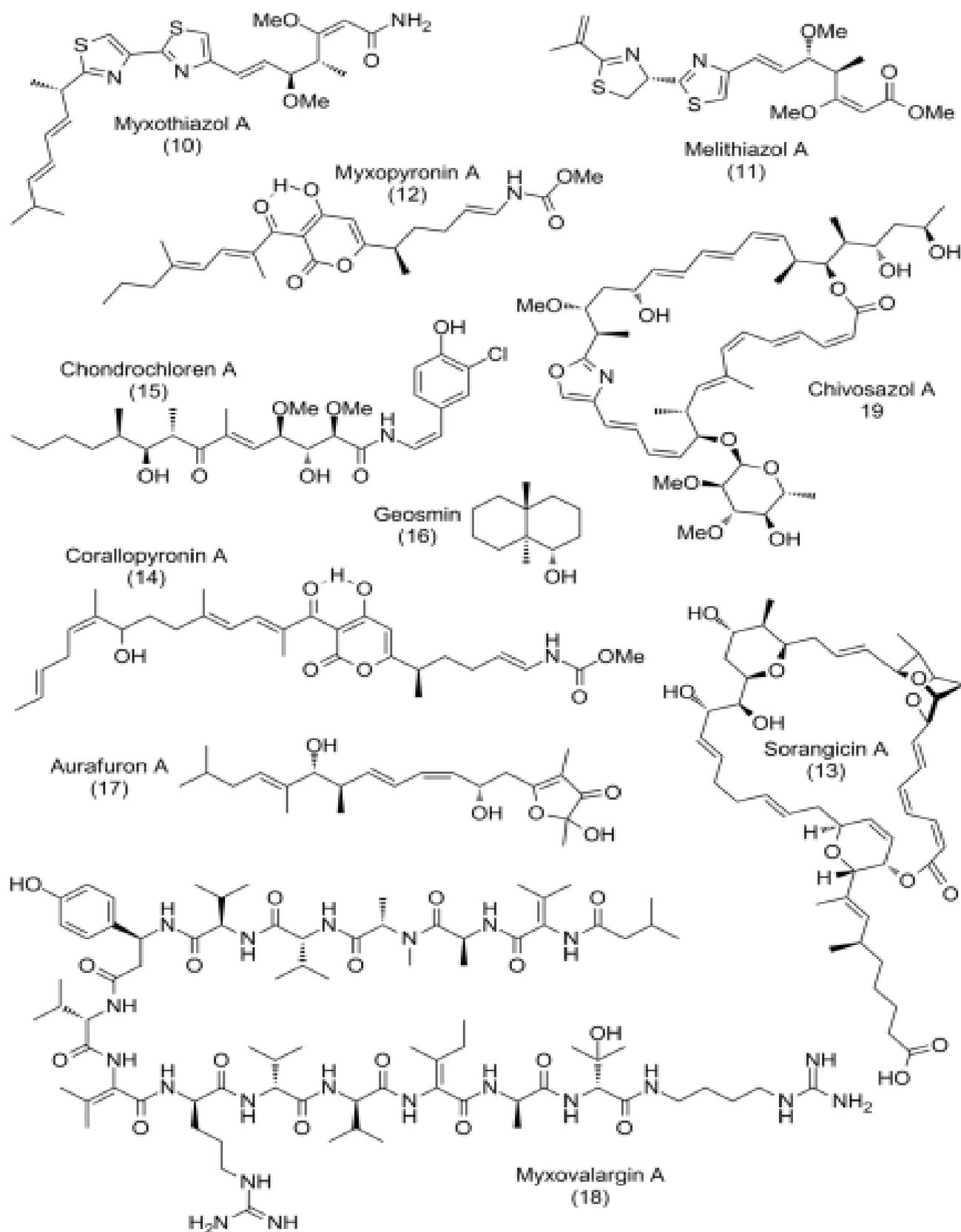


Figure 6 : Structures chimique de certains métabolites Myxobactériens bioactifs (Garcia et al.,2009).

Métabolisme secondaire des Myxobactéries

Tableau 1 : Certains métabolites secondaires produits par les myxobactéries.

Composés	Activités biologiques	Espèces/isolats	Références
Epothilone B	Cytotoxique Antivirale	<i>Sorangium cellulosum</i>	Bollag et al.,1995 Martinez et al.,2013
Tubulysin A	Anti-microtubule Antigiogénique	<i>Soragium cellulosum</i>	F. Sasse et al., 200 M. W. Khalil et al., 2006
Argyrin A	Antibactérienne Antitumorale	<i>Soragium cellulosum</i>	I. Nickeleit et al., 2006
Disorazol A	Antibacterienne Antifongique	<i>Soragium cellulosum</i>	Y. A. Elnakady et al., 2006
Chondramid A	Antitumorale	<i>Chondromyces crocatus</i>	F. Sasse et al., 1998
Rhizopodin A	Antitumorale Antifongique (faible effet)	<i>Myxococcus stipitatus</i>	G. Hagelueken et al., 2009
Soraphen Ala	Antifongique, Stimulation de l'insuline, Antivirale Cancericide	<i>Soragium cellulosum</i>	Schreurs et al.,2009 Koutsodakis et al.,2015 A. Beckers et al., 2007
Stigmatellin A	Antifongique	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	H. F. Vahlensieck et al., 1994 G. Thierbach et al., 1984
Thuggacin A	Antibactérienne	<i>Soragium cellulosum</i>	H. Irschik et al., 2007 H. Steinmetz et al., 2007
Myxothiazol A	Antifongique Cytostatique	<i>Myxococcus fulvus</i>	K. Gerth et al., 1980 F. Sasse et al., 1999
Melithiazol A	Antifongique Cytostatique	<i>Melittangium lichenicola</i>	K. Gerth et al., 1980 F. Sasse et al., 1999
Myxopyronin A	Antimicrobienne	<i>Myxococcus fulvus</i>	H. Irschik et al., 1985 H. Irschik et al., 1987
Sorangicin A	Antimicrobienne	<i>Soragium cellulosum</i>	H. Irschik et al., 1985 H. Irschik et al., 1987
Corallopyronin A	Antibactérienne	<i>Corallocooccus coralloides</i>	H. Irschik et al., 1985 H. Irschik et al., 1987
Chondrochloren A	Antibactérienne	<i>Chondromyces crocatus</i>	R. Jansen et al., 2003
Geosmin	/	<i>Myxococcus xanthus</i> <i>Stigmatella aurantiaca</i>	W. Trowitsch et al., 1981
Aurafuron A	Antifongique Cytotoxique	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	J. Staunton et al., 2008
Myxovalargin A	Antibactérienne Cytotoxique	<i>Myxococcus fulvus</i>	H. Irschik et al., 1985

Métabolisme secondaire des Myxobactéries

Chivosazol A	Antimicrobienne (levure et champignons filamenteux, puissant contre les cellules des mammifères)	<i>Sorangium cellulosum</i>	R. Müller et al., 2006
---------------------	--	-----------------------------	-------------------------------

III.4. L'intérêt

Les activités biologiques antibactérienne, antifongique, antiviral, anti malaria, cytotoxique et même immunosuppressive et stimulatrice d'insuline, des métabolites myxobactériens aussi bien que leurs structures chimiques et modes d'action uniques sont à l'origine de leur grand intérêt pharmaceutique (**Mohr 2018**).

Ces substances antibiotiques ont un large spectre d'action et donc, une efficacité sur de nombreux maux ou maladies, ainsi qu'une piste de réflexion autour de l'accroissement du problème de résistance antibiotique en médecine.

D'autre part la synthèse des acides gras polyinsaturés récemment observée offre la possibilité de les utiliser pour le traitement de désordres cardiovasculaires, cérébrale où en domaine industriel comme complément additionné aux plusieurs types d'aliments et produits laitiers (**Garcia 2011**).

IV. Matériel et méthodes

IV.1. Objectif

L'objectif principal de notre travail consiste à la recherche des souches éventuellement productrices des métabolites bioactives. Le but consiste à l'isolement, la purification des myxobactéries et l'extraction des métabolites secondaires. Les molécules bioactives des myxobactéries sont en générale des métabolites secondaires qui nécessitent le lancement d'une fermentation pour récupérer une quantité suffisante à la réalisation des différents tests de caractérisation. Les substances bioactives doivent subir une extraction avec le solvant et la technique adéquate.

La caractérisation des molécules va se dérouler dans un ordre chronologique qui permet de choisir les meilleures techniques de séparation et de l'identification à savoir :

- ❖ Le test de l'activité antagoniste par méthode de cylindre d'agar.
- ❖ La production des métabolites dans les milieux solide et extraction.
- ❖ Le test de l'activité des extraits contre différentes bactéries.
- ❖ Le spectre UV-Visible de l'extrait brut pour le choix du système de séparation adéquat.
- ❖ Une CCM pour la séparation de différents composés de l'extrait brut obtenus par Fermentation.
- ❖ Extraction et test des molécules obtenues.

Ce travail a été réalisé au laboratoire N°4 de l'université de Saida-Dr Dr. MOULAY TAHAR, Faculté des sciences Département de biologie.

Les souches des myxobactéries servant d'objet de ce travail sont isolées à partir d'échantillons de sols et de sédiments marins de différentes régions : Ain Defla, Saïda, Alger et Mostaganem.

IV.2. L'échantillonnage

IV.2.1. La collecte

Pour l'échantillonnage : les sédiments marins, la rhizosphère du Jujubier " *Ziziphus* ", l'armoise " *Artemisia* ", Pistachier lantisque " *Pistacia lentiscus* " ont été choisis en se basant sur les observations de **Reichenbach et Dworkin (1992)**. Deux échantillons de sédiments marins et quatre échantillons de sol rhizosphérique du Jujubier, d'Armoise et Pistachier lantisque sont prélevés à partir de différentes zones indiquées dans la **Figure 8** durant les mois de janvier et février 2022.

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



Figure 7 : la méthode de collecte



Saïda "Skhouna "

Plage Alger centre

Ain Defla " Jujubier "

Ain Defla " Pistachier lantisque

Figure 8 : Les Zones de prélèvement.



A : Alger, B : Ain Défla, C : Mostaganem, D : Saïda

Figure 9 : Carte géographique montrant les zones de prélèvement des échantillons (Google maps)

IV.3. Les traitements des échantillons

IV.3.1. Le séchage

Les échantillons doivent être séchés à température ambiante, pour éliminer les formes végétatives des micro-organismes (Reichenbach et Dworkin.,1992).

IV.3.2. Le tamisage

Il est effectué à l'aide d'un tamis muni de pores de 250µm de diamètres pour éliminer les gros granulés, ainsi que les débris végétaux.

IV.4. L'isolement des myxobactéries

IV.4.1. L'isolement des myxobactéries cellulolytiques

IV.4.1.1. Méthode de papier filtre

Pour l'isolement des myxobactéries cellulolytiques, le milieu minérale ST21 (voir annexe) est utilisé avec la cellulose comme seule source de carbone (Shimkets et al., 2006). En effet la cellulose est utilisé sous forme de petits morceaux de papier filtre autoclavés (Whatman N°1), qui sont appliqués à la surface de la gélose à raison de 3 à 4 morceaux par boîte, sur chaque morceau une petite quantité de sol sec est placée (Figure 10). L'incubation se fait à 30 C° durant 20 à 25 jours (Mohr et al.,2016).



Figure 10: méthode de papier filtre

Le milieu ST21 est préparé à partir de deux solutions minérales A et B qui sont stérilisés à l'autoclave séparément puis combinées. Le pH de chaque solution est ajusté à 7,2 avant la stérilisation. Le milieu peut être supplémenté de fongicide Cycloheximide (50 mg/l) afin d'inhiber la croissance des champignons (Mohr et al.,2016).

IV.4.1.2. Méthode de Fumier de lapin

Les excréments de lapin utilisés pour l'appâtage doivent être prélevés sur des animaux sauvages, les excréments de lapins de laboratoire ou domestiques sont généralement inadapté, car ils peuvent rentrer en contact avec l'urine, cela fausserait nos résultats.

Après l'autoclavage de fumier de lapin, le milieu minérale ST21 est utilisé avec ce dernier comme seule source de carbone, on ajoute cinq (5) crottes (granulés) de Fumier lapin par boîte, sur chaque morceau une petite quantité de sol sec est placée (**figure 11**) L'incubation se fait à 30°C durant 20 à 25 jours (Mohr et al.,2016).



Figure 11 : méthode de fumier de lapin

IV.4.2. L'isolement des myxobactéries micro-prédateurs

IV.4.2.1. Méthode de proie bactérienne

IV.4.2.1.1. *E. coli* vivante

La plupart des myxobactéries sont des micro-prédateurs qui se nourrissent par la lyse des autres micro-organismes, ce qui les caractérise lors de l'isolement. Pour les isoler le milieu Water-agar est utilisé avec *E. coli* vivante comme seule source de carbone.

Après l'ajustement du pH à 7,2 et la stérilisation, l'*E. coli* vivante estensemencée à la surface du milieu Water-agar en forme de croix (X) à l'aide d'une micropipette sur les quatre extrémités de croix, des petites quantités de sol sec sont placées (**Figure 13**). Les boîtes sont ensuite incubées à 30 C° pendant 20 à 25 jours.

(Mohr et al.,2016).



Figure 12 : méthode de proie bactérienne (*E. coli* vivante)

IV.4.2.1.2. *E. coli* morte :

L'*E. coli* est cultivée dans 10 ml de bouillon Luria (Annexe), puis l'incuber à 37°C pendant 24 heures, la culture bactérienne a été traitée par la chaleur à 80°C pendant 40 min, après l'ajustement du pH à 7,2 et la stérilisation l'*E. coli* morte (par la chaleur) estensemencée à la surface du milieu Water-agar en forme de croix (X) à l'aide de micropipette, sur les quatre extrémités de croix, des petites quantités de sol sec sont placées (**Figure 14**). Les boîtes sont ensuite incubées à 30 C° pendant 20 à 25 jours (Mohr et al.,2016).

Matériel et méthodes

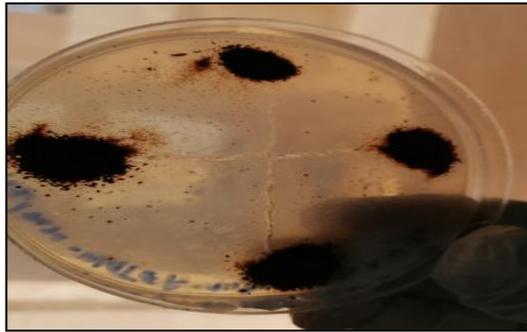


Figure 13 : Méthode de proie bactérienne (*E. coli* morte)

Tableau 2 : les méthodes utilisées et leurs codes

Codes	Méthodes
M I	Méthode de papier
M II	Méthode de fumier de lapin
M III	Méthode <i>E. coli</i> vivante
M IV	Méthode <i>E. coli</i> morte

Tableau 3 : les isolats et leurs codes

Code	Isolats
S16S	Sédiment plage d'Alger
S27S	Sédiment plage de Mostaganem
S20A	Sol rhizosphérique de l'armoise (Saida)
S20Z	Sol rhizosphérique de Ziziphus (Saida)
S44Z	Sol rhizosphérique de Ziziphus (Ain Defla)
S44p	Sol rhizosphérique de pestasia (Ain Defla)

Pour les quatre méthodes d'isolement, les boîtes sont vérifiées régulièrement à partir du troisième jour par une loupe binoculaire Gx20 et Gx40.

Toutes opérations sont faites dans la zone aseptique (15 cm autour de la flamme d'un bec Bunsen).

IV.5. La purification

Les milieux utilisés pour la purification des isolats sont le ST21 agar et le CY agar (voir annexe), le pH est ajusté à 7.2 (Mohr et al.,2016).

La première étape de purification consiste au transfert des fragments des essaims de Myxobactéries ‘‘swarming bodies’’ de la boîte d’isolement mise sous la loupe binoculaire aux milieux de purification à l’aide d’une anse de platine flambée et refroidie à chaque fois. Un prélèvement est effectué à partir d’une colonie isolée de *Myxobactéries* et déposée délicatement dans la nouvelle boîte en l’ensemencant par la méthode de stries serrée dans les milieux solides ST21 et le CY agar, l’incubation se fait à 30°C pendant 5 à 8 jours.

Les étapes ultérieures consistent au repiquage successif jusqu’à l’obtention des colonies pures.

Après plusieurs transferts la pureté des souches est vérifiée sous le microscope.

Toutes opérations sont faites dans la zone aseptique (15 cm autour de la flamme d’un bec Bunsen).

IV.5.1. La vérification de la pureté des souches

Les isolats obtenus sont vérifiés à l’aide d’une loupe binoculaire. Une observation microscopique est ensuite réalisée après coloration simple au bleu de méthylène et coloration de Gram.

IV.6. La mise en évidence de l’activité antagoniste

Une expérience pour apprendre l’activité antagoniste des isolats myxobactériennes par méthode de cylindre d’agar, à tenir sur le milieu solide Muller-Hinton contre plusieurs bactéries à Gram négatif, positif et levure pathogènes pour l’homme. (Xie et al.,2005; Kumar et al.,2012).

Les germes cibles utilisés sont le suivant:

- **Les bactéries à Gram négatif** : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.
- **Les bactéries à Gram positif** : *Staphylococcus aureus* MRSA, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*.
- **Levure** : *Candida albicans*.

Tableau 4: Les bactéries cibles et leurs codes ATCC

Bactérie	Code ATCC
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27863
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	ATCC 33591
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC10876
<i>Candida Albicans</i>	ATCC 10231

IV.6.1. Le Test de l'activité biologique

IV.6.1.1. Confirmation de l'identité des souches cibles

Les souches sont identifiées au niveau de laboratoire de l'université Moulay Tahar de Saida par différentes méthodes par leur aspect microscopique, par observation directe sous microscope optique et par test de catalase.

IV.6.1.2. La préparation de l'inoculum

L'inoculum des microorganismes cibles est préparé à partir des cultures pures jeunes moins de 24h de manière que la charge microbienne soit 10^8 UFC/ml en utilisant un étalon Mc Farland qui correspond à une absorbance entre 0,08 et 0,1 sur la longueur d'onde 620 nm du spectrophotomètre, l'étalon de turbidité McFarland de 0,5 fournit une densité optique comparable à la densité d'une suspension bactérienne avec $1,5 \times 10^8$ unités formant colonies (UFC/ml).

Dans chaque suspension la charge des cellules est ajustée pour arriver à celle désirée, ensuite elles sontensemencées en tapis sur le milieu Muller-Hinton à l'aide d'un écouvillon. (Xie et al.,2005; Kumar et al.,2012).

IV.6.1.3. Méthode des cylindres d'agar

L'activité des isolats est testés par la méthode des cylindres d'agar à partir des boites purifier des Myxobactéries, des cylindres de 6 mm de diamètre sont découpés stérilement à partir des cultures des isolats à l'aide d'un emporte-pièce, puis placés dans les boites de Muller-Hinton préalablementensemencé avec les germes cibles.

Les boites doivent être mises au 4 °C pendant 2 heures avant l'incubation pour s'assurer de la bonne diffusion des substances bioactives, ensuite seront incubées à 37 °C pendant 24 heures.

IV.7. Production de métabolites secondaire

IV.7.1 Fermentation et extraction

IV.7.1.1 La fermentation

Les conditions de culture ayant des paramètres plus rentables, tant au niveau de substrat, de la biomasse que du temps, ont été retenues pour la culture. Les milieuxensemencés d'un volume suffisant pour obtenir une quantité exploitable de métabolite, huit (8) boites sont incubés, quatre boites pour l'isolat S16s MI et quatre boites pour S27s MIV dans un incubateur à 30 C° pendant 8 jours.

IV.7.1.2. L'extraction

Le but de cette étape consiste à extraire les métabolites secondaires produits au cours des cultures fermentatives.

Les microorganismes en culture produisent des métabolites secondaires à la fin de la phase de croissance et durant la phase stationnaire. Ces métabolites secondaires peuvent être sécrétés dans le filtrat de culture ou stockés à l'intérieur des cellules bactériennes.

L'extraction consiste à faire passer les métabolites qui se trouvent dans le filtrat de culture à un autre solvant (acétate d'éthyle, méthanol) d'où il est facilement isolable (par évaporation). Pour extraire ces produits, le filtrat de culture est soumis à divers traitements, qu'ils soient physiques (évaporation) ou chimiques, au moyen des solvants à différentes polarités. Ces différents traitements sont alors combinés pour extraire les métabolites secondaires se trouvant dans les cultures fermentatives. Chaque milieu de culture est d'abord découpé en des petits morceaux pour faciliter l'agitation pour permettre la lyse cellulaire et ainsi d'en sortir les métabolites contenus à l'intérieur. Les milieux sont ensuite filtrés à travers un papier filtre afin d'éliminer les impuretés.

L'acétate d'éthyle est ajouté au filtrat de culture à volume égal (12 ml chaque boîte) et l'ensemble est versé dans un Erlenmeyer et agité vigoureusement pour permettre le passage des éléments à extraire (éléments solubles) vers le solvant (AceOt), après un temps de repos de quelques minutes (environ 10 min), deux phases séparées sont obtenues : une phase solide (milieu de culture) et une phase aqueuse. Le même processus est répété pour faire l'extraction du deuxième extrait des souches (cellulolytiques).

Les restes d'éléments non extraits avec l'acétate d'éthyle sont ensuite récupérés par le méthanol. L'évaporation de la phase aqueuse dans le rota vapeur à 25°C pendant 2min. Les extraits obtenus sont pesés à l'aide d'une balance de précision et conservés à la température ambiante en attendant les analyses d'activité biologique.



Découpage de milieu de culture



L'agitation du milieu avec le solvant



Filtration de l'extrait



Vaporisation du solvant

Figure 14 : illustration résumant les étapes de l'extraction des métabolites bioactives à partir du milieu solide CY

IV.8. Test d'activité antimicrobienne des extraits

Cette étape a pour objectif d'évaluer l'activité antimicrobienne des métabolites secondaires des extraits de souche S27s MIV et S16s MI.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne se fait par différentes méthodes d'analyse standardisée permettant d'apprécier la capacité des métabolites secondaires extraits à inhiber la croissance bactérienne. La méthode de diffusion sur gélose permet de mettre en évidence la propriété inhibitrice d'un extrait par la présence de zone d'inhibition de la croissance bactérienne sur milieu solide.

Une culture en nappe est effectuée sur du milieu solide à partir de l'inoculum de 10^8 UFC/ml de germe, puis séchée après quelques minutes (03 min environ). Sept puits sont creusés sur la gélose déjàensemencée.



Figure 15: méthode de puits

Trois de ces puits sont remplis avec 20 μ L d'extrait 1 des Myxobactéries (micro prédateurs) issues de l'extraction à l'acétate d'éthyle ou au méthanol et dilués avec le même solvant d'extraction pour avoir des concentrations de 25%, 50% et 75%.

Les trois puits restant sont remplis avec 20 μ L d'extraits N°2 des Myxobactéries (Cellulolytiques) et dilués pour avoir des concentrations de 25%, 50% et 75%.

Un puits correspond au témoin négatif (rempli de 20 μ L de solvant d'extraction pure : méthanol ou acétate d'éthyle).

Les boîtes sont incubées à 37° pendant 24 heures. Après la période d'incubation, la présence de zone d'inhibition est recherchée.

Toutes opérations sont faites dans la zone aseptique (15 cm autour de la flamme d'un bec Bunsen).

IV.9. La mise au point de la chromatographie sur couche mince CCM

Cette méthode repose sur la combinaison de la migration de l'extrait N°02 à analyser sur une plaque de silice et la révélation de la plaque par observation directe sous lumière UV.

L'extrait est concentré à 352,5 mg/ml et le volume de dépôt est de 20 µL sur chaque point par une micropipette.

$$RF = \frac{X}{Y}$$

RF : Référence frontale.

X : Distance parcourue par le produit

Y : Distance parcourue par le solvant

IV.9.1. Le choix du meilleur système de solvant pour la séparation

Une méthode simple pour trouver le système approprié consiste à préparer des différents systèmes à des différents pourcentages en Acétate d'éthyle et Méthanol (AcOET /MeOH).

Système N°1 : AcOET /MeOH [1/9], Système N°2 : AcOET /MeOH [2/8], Système N°3 : AcOET /MeOH [3/7], Système N°4 : AcOET /MeOH [4/6], Système N°5 : AcOET /MeOH [5/5], Système N°6 : AcOET /MeOH [6/4], Système N°7 : AcOET /MeOH [9/1]

A l'aide d'une micropipette on dépose des gouttes de chaque extrait sur une plaque, le meilleur système est celui qui donne le plus de fractions.

Sur une plaque de silice en phase normale, l'extrait N°02 est déposé s sur la ligne de dépôt à l'aide d'une micropipette. La plaque est ensuite placée dans la cuve chromatographique contenant 100 ml de système de solvants de migration.

La plaque est retirée de la cuve lorsque la migration arrive à 1cm du bord supérieur de la plaque et elle est ensuite séchée et révélée à la lumière U-V (longueurs d'onde 254 nm et 366nm). Les différentes bandes observées sont marquées.

IV.9.2 L'extraction des trois molécules séparées par la CCM

Après la séparation de l'extrait N°2 par la CCM, la plaque a été découpé pour avoir les trois bandes où les molécules ont étai disposer. Apres, on gratte le silice de la bande dans un bécher et on ajoute 5ml de méthanol MeOH, après l'agitation pendant 30min a peu près, la solution est ensuite filtrée à travers un papier filtre afin d'éliminer les impuretés.

*le même processus se fait pour extraire les deux molécules restantes.

IV.9.3 Le test d'activité antimicrobienne des molécules extraites

Pour mettre en évidence l'activité inhibitrice de ces molécules, ces trois (3) extraits sont testés sur des bactéries cibles.

La méthode de diffusion sur gélose permet de mettre en évidence la propriété inhibitrice des extraits par la présence d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne sur milieu solide Muller-Hinton.

Une culture en nappe est effectuée sur du milieu solide MH à partir de l'inoculum de 10^8 UFC/ml de germe, puis séchée après quelques minutes (03 min environ). Quatre (4) puits sont creusés sur la gélose déjà ensemencée.

Chacun de ces puits est rempli avec 20 μ L d'extrait des trois molécules obtenues par la séparation de l'extrait N°2

Le dernier puits restant correspond au témoin (rempli de 20 μ L de solvant d'extraction pure : méthanol MeOH).

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Après la période d'incubation, la présence d'une zone d'inhibition est recherchée.

Toutes opérations sont faites dans la zone aseptique (15 cm autour de la flamme d'un bec Bunsen).

IV.10. Conservation des souches Myxobactériennes

IV.10.1. Longue durée

Les souches bactériennes jeunes sont ensemencées sur des eppendorfs après l'ajout de 1ml de milieu CY puis on ajoute 1ml de glycérol, la culture peut se conserver :

- un an à température ambiante,
- 3 ans à 4 °C.



Figure 16 : Conservation dans les eppendorfs

V. Résultats et discussion

V.1. Les résultats d'isolement des myxobactéries cellulolytiques

V.1.1. La méthode de papier filtre

Après 25 jours d'incubation à 30°C sur le milieu ST21, la couleur de papier est devenue jaune orange avec la manifestation des taches noires résultant la dégradation du cellulose par les myxobactéries (figure18).



Figure 17: L'isolement par méthode de papier filtre

V.1.2. La méthode de fumier de lapin

Au bout d'une incubation de 25 jours à 30°C, Les myxobactéries apparaissent sur le milieu ST21 et se développent lentement, Les colonies ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique au myxobactéries, une apparition des corps fruitiers de forme sphérique de couleur orange et jaune qui entoure le sol de certain échantillons.

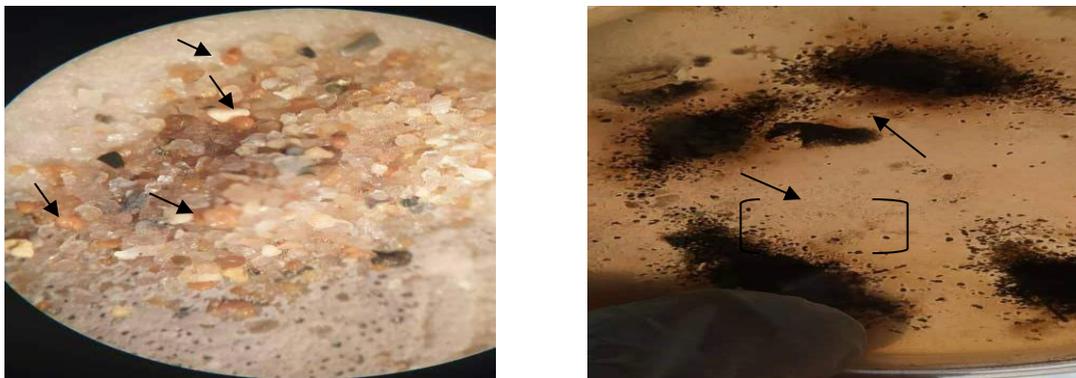


Figure 18: L'isolement par méthode de fumier de lapin

V.2. Les résultats d'isolement des Myxobactéries bactériolytiques

V.2.1. Méthode d'*E. coli* vivante

On a observé la formation des essaims de myxobactéries après 25 jours d'incubation à 30°C de nos échantillons dans le milieu Water-agar, qui signifie la lyse des cellules *E.coli* vivantes par les isolats myxobactériennes et l'utilisation de paroi bactérienne comme source de carbone.



Figure 19 : L'isolement par méthode *E. coli* vivante

V.2.2. La méthode d'*E.coli* morte

Après 25 jours d'incubation à 30°C de nos échantillons dans le milieu Water-agar. On a observé la formation des essaims de myxobactéries.



Figure 20 : L'isolement par méthode *E. coli* morte

V.3. Les résultats et interprétation d'isolement

Six (6) échantillons, dont quatre sols et deux sédiments marins sont utilisés pour l'isolement de myxobactéries dans cette étude. Les résultats de nombre des isolats obtenus par les différentes méthodes d'isolement sont représentés dans le tableau 4.

Etant donné les souches myxobactériennes sont considérées comme très bonne sources de molécules bioactives a intérêt médical, le but principal de notre travail est l'isolement des myxobactéries productrices de molécules bioactives.

En effet leurs criblage pour les différentes bioactivités en générale les activités antimicrobienne en particulier est souvent problématique à cause de déficelés qui accompagnent le processus d'isolement et de purification (**Reichenbach 1993**).

Tableau 5 : les isolats obtenus par chaque méthode

	Säida		Ain Défla		Alger	Mosraganem
	S20Z	S20A	S44Z	S44P	S16S	S27S
M.I	-	-	-	-	+	+
M.II	+	+	+	+	+	+
M.III	+	-	+	+	+	+
M.IV (T°)	+	+	+	+	+	+

Deux échantillons de sol rhizosphérique séchés de jujubier(*Ziziphus*), l'armoise (*artemisia*), Pistachier (*pestisia*) et de sédiments marins ont été Collectés a partir de Quatre zones semi-*aride*, *subhumide de l'Algérie*, ont été utilisé pour l'isolement des *Myxobactéries* par les méthodes de paroi bactérienne (*E. coli* vivante / morte) et de papier filtre, fumier de lapin.

Le processus de purification a donné un total de 19 isolats observé directement dans les boîtes d'isolement.

Les méthodes d'isolement et la purification des myxobactéries sont difficiles par rapport aux autres bactéries en raison de leurs caractéristiques spécifiques.

La présence d'une contamination intensive pour la méthode de fumier de lapin due à l'absence de cyclohyximide, donc seulement 2 souches sont purifie avec succès.

Résultat et discussion

Dans ce tableau on remarque que tous les isolats ont poussés par les méthodes de fumier de lapin et de *E. coli* morte, les isolats de sédiments marins S27s et S16s ont poussé par toutes les méthodes.

V.4. Caractères morphologiques

Les organismes analysés dans ce travail ont tous une forme bacillaire ou de tige sous microscope optique (Gx100), et un aspect des essaims sur gélose (mouvement par glissement) en plus de la formation de corps de fructification ce qui est caractéristique des myxobactéries.

V.4.1. Corps de fructification

Observés directement à partir des boites d'isolement par la loupe binoculaire (Gx20 ou Gx40), les corps de fructification sont en générale de couleurs orange, blanche, jaune, marron, transparente et rarement rose claire ou crème et orange foncé, la forme est sphérique bombée.



Figure 21 : Observation directe de corps de fructification Myxobactériens par loupe binoculaire Gx20.

V.4.2. Colonie sur milieu solide

Les colonies sont transparentes pour la plupart, formant des essaims radiales ou ce qu'on appelle « swarming » sur la surface du milieu solide.



Figure 22 : les essaims des Myxobactéries



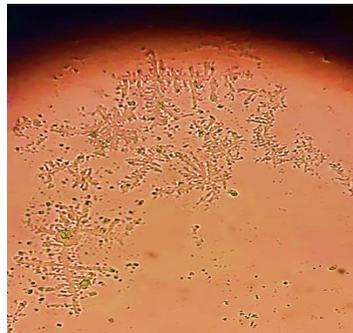
Figure 23: observation des essaims sous loupe binoculaire GX20

V.4.3. Aspect microscopique

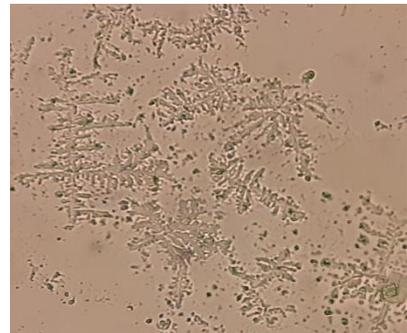
Sous microscope optique les cellules végétatives apparaissent en forme de bacilles ou tiges minces avec des extrémités plus ou moins effilées en forme de cigare, de bateau ou d'aiguille.



X10



X40



X100

Figure 24: observation microscopique des Myxobactéries a l'état frais

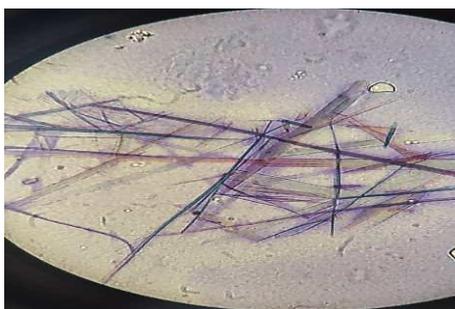


Figure 25 : observation microscopique des cellules myxobactériennes végétatives colorés par le bleu de méthylène

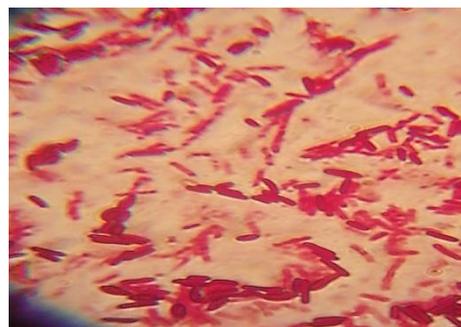


Figure 26 : observation microscopique par coloration de gram

V.5. Purification des isolats de myxobactéries

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

Les isolats myxobactériens aient été obtenues sur le milieu CY-agar et ST21-agar (Annexe) sont ensuite été purifiés par le processus de transfert des colonies de plusieurs fois sur les mêmes milieux (Annexe) jusqu'à ce que les cultures pures des myxobactéries aient été obtenues (**Meliah et Lisdiyanti, 2018**).



Figure 27 : purification des isolats myxobactériennes

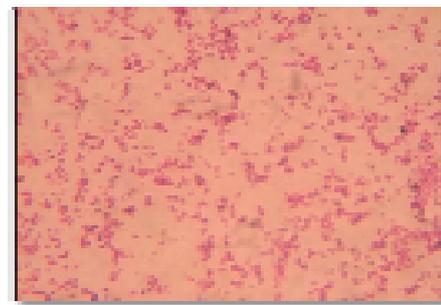
* On n'a pas purifié les souches isolé par la méthode de fumier de lapin à cause de la contamination des boites par les champignons (malgré l'autoclavage du fumier).

V.6. Confirmation des souches cibles

Les résultats sont résumés dans les photos ci- dessous.



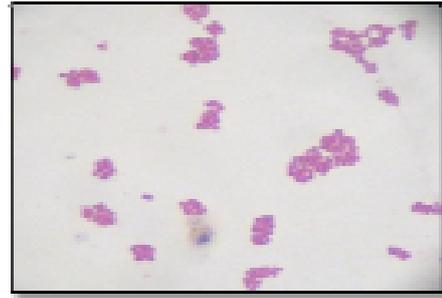
B. subtilis (Gram +)



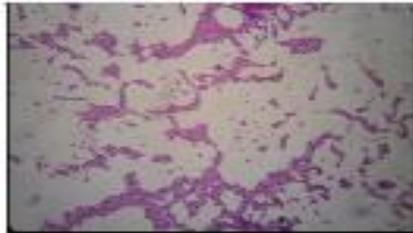
E. coli (Gram-)



P. aeruginosa (Gram-)



S. aureus (Gram+)



L. monocytogenes

Tableau 6 : résultat du test catalase sur les souches cibles

Souches	Catalase
<i>E. coli</i>	+
<i>P. aeruginosa</i>	+
<i>S. aureus</i>	+
<i>B. subtilis</i>	+
<i>L. monocytogenes</i>	+

V.7. L'activité antimicrobienne des isolats myxobactériennes contre les souches indicatrices (Technique de cylindres d'agar)

L'évaluation du pouvoir antagoniste de trois souches myxobactériennes a été étudié vis-à-vis cinq souches cibles, indicatrices, à savoir ; deux bactéries à Gram positif : *Staphylococcus spp* (ATCC 259223), *staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 10876). Et deux bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas spp*, fungi *Candida albicans* (ATCC 10231). Par une méthode directe (méthode de cylindre d'agar).

V.7.1. Technique de cylindres d'agar

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 5. Les valeurs mentionnées représentent les diamètres des zones d'inhibition mesurées autour du cylindre d'agar posé sur le milieu contenant

Résultat et discussion

les souches indicatrices ensemencées en surface. L'effet inhibiteur (Figure 29) est obtenu par la diffusion de la substance bioactive en milieu gélosé.

Tableau 7 : Résultat de l'activité antibactérienne des neuf isolats contre les six souches indicatrices déterminées par la méthode de cylindres d'agar.

Les isolats Myxobactérienn es	Diamètre des zones d'inhibition (mm)					
	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas spp</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>C.albicans</i>	<i>Staphylococcus MRSA</i>
S16s M I	8	14	17	7	0	13
S27s M III	9	10	11	0	9	0
S44z M III	0	0	0	0	0	0
S44p M III	0	0	9	0	7	12
S16s M IV	8	12	10	0	8	8
S20a M IV	0	0	0	0	0	0
S20z M IV	0	0	0	0	0	0
S44p M IV	0	7	10	8	0	0
S27s M IV	13	8	14	10	10	12

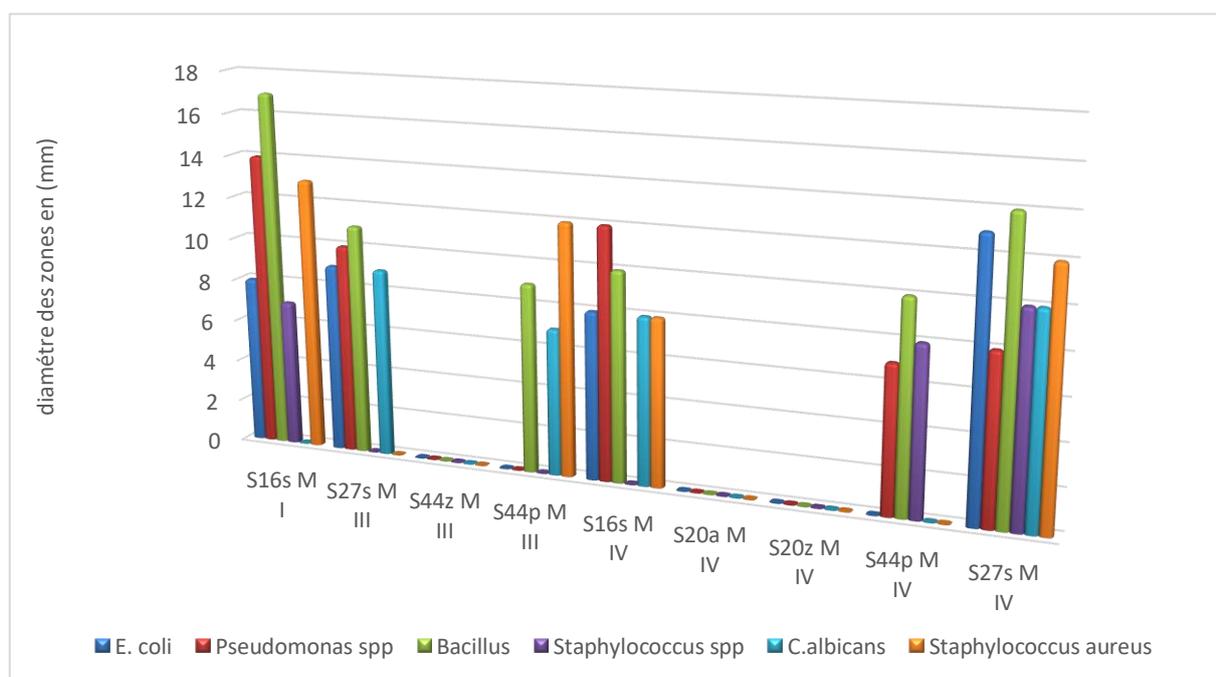


Figure 28 : Un diagramme représente les diamètres des zones d'inhibition des neuf isolats contre les six souches pathogènes tests (Technique de cylindres d'agar).

Résultat et discussion

La souche **S16s M I** possède une activité importante contre *Bacillus subtilis* (17 mm) qui représente la plus grande zone d'inhibition du test, contrairement à la souche indicatrice *C.albicans* qui démontre une résistance totale à la souche myxobactériennes **S16s M I**.

La souche **S27s M III** possède une activité importante contre *Bacillus subtilis* (11 mm), contrairement à la souche indicatrice *Staphylococcus spp* et *Staphylococcus aureus MRSA* qui démontre une résistance totale à la souche myxobactériennes **S27s M III**.

La souche **S44p MIII** possède une activité importante contre *Staphylococcus aureus MRSA* (12 mm), contrairement à la souche indicatrice *Staphylococcus spp* et *E.coli* et *Pseudomonas spp* qui démontre une résistance totale à la souche myxobactériennes **S44p M III**.

La souche **S44p MIV** possède une activité importante contre *Bacillus* (10 mm), contrairement à la souche indicatrice *Staphylococcus aureus MRSA*, *E.coli* et *C.albicans* qui démontre une résistance totale à la souche myxobactériennes **S44p M III**.

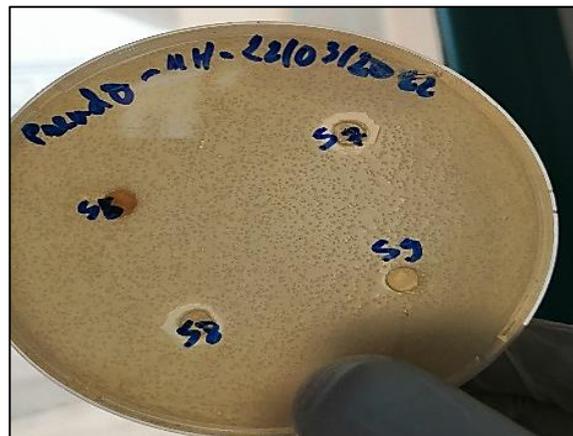
La souche **S27s MIV** possède une activité importante contre *Bacillus* (14 mm), contrairement à la souche indicatrice *Pseudomonas spp* qui démontre une faible activité.

La souche **S16S MIV** possède une activité importante contre *Pseudomonas spp* (12 mm), contrairement à la souche indicatrice *Staphylococcus spp* qui démontre une résistance totale à la souche myxobactériennes **S16s MIV**.

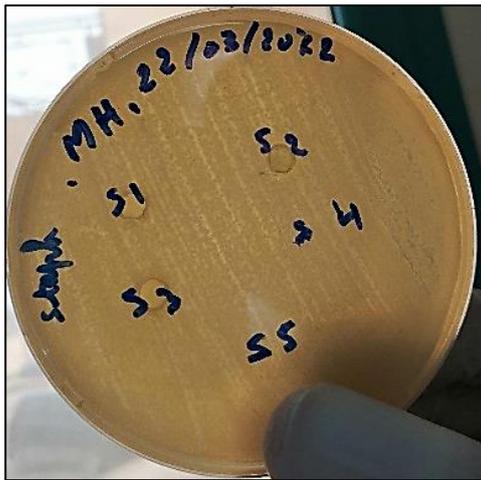
Les bactéries test : *Staphylococcus aureus MRSA*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Pseudomonas*, *C.albicans* et *Bacillus subtilis* ont démontrées une résistance totale aux souches myxobactériennes **S44z MIII**, **S20a MIV**, **S20z MIV**



Staphylococcus aureus MRSA



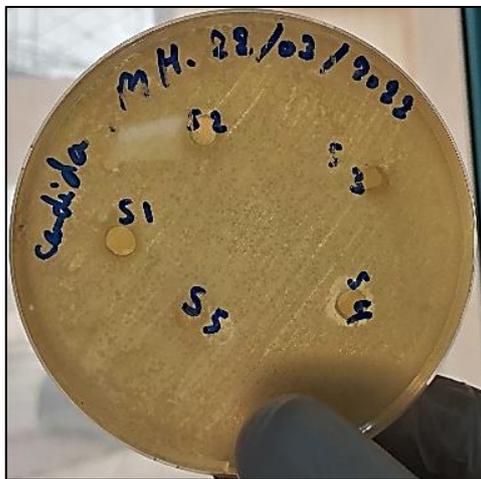
Pseudomonas spp



Staphylococcus aureus



Bacillus subtilis



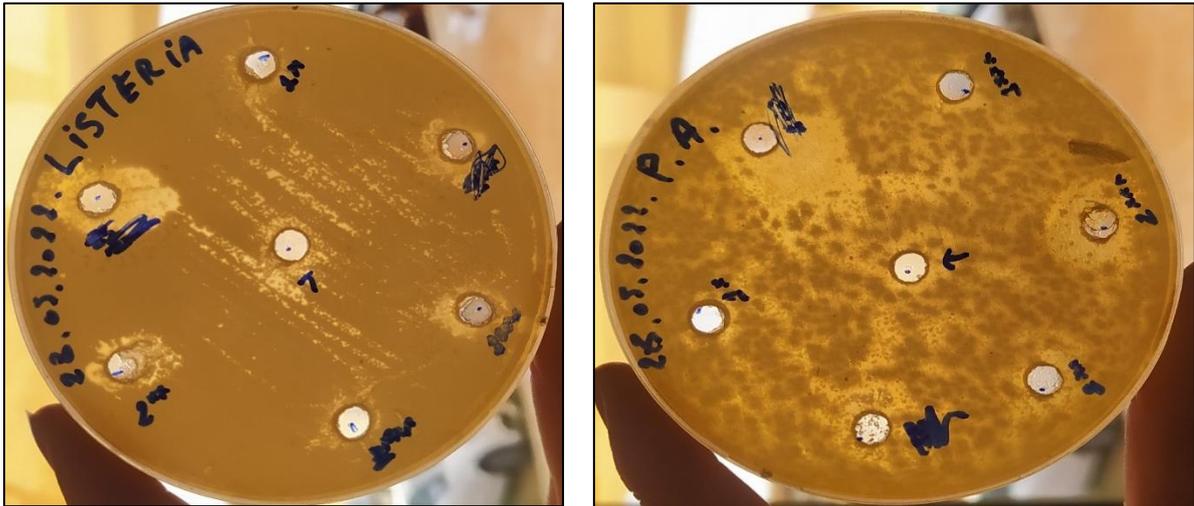
Candida albicans

Figure 29: L'activité antibactérienne des isolats Mycobactériennes contre les souches indicatrices (Technique de cylindres d'agar).

V.8. Test d'activité antimicrobienne des extraits

La méthode des puits utilisée pour la mise en évidence l'activité antibactérienne des extraits a démontré que les deux extraits sont actifs sur les trois bactéries-test, cette activité est mise en évidence par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du puit contenu un volume de 20 μ L de l'extrait.

Résultat et discussion



Listeria monocytogenes

Pseudomonas aeruginosa

Figure 30 : L'activité antibactérienne des deux extraits

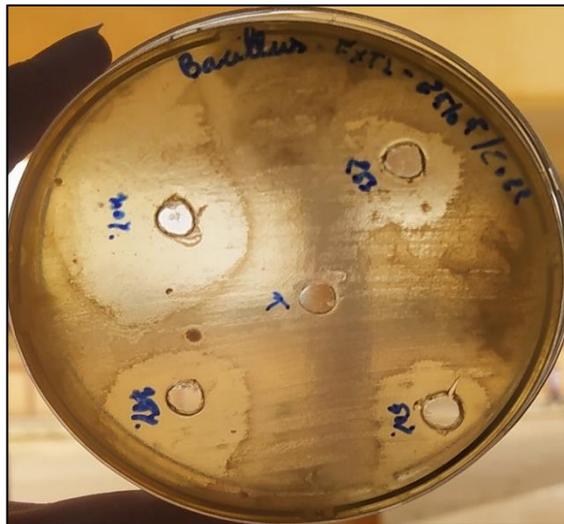


Figure 31 : l'activité de l'extrait N°1 sur *Bacillus subtilis*

Tableau 8 : Le diamètre des zones d'inhibition des deux extraits contre les trois souches pathogènes test (Technique de puits).

Concentration Souches cible	Extrait 01				Extrait 02		
	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	11	11	ND	17	0	0
<i>P.aeruginosa</i>	0	18	0	ND	0	0	15
<i>Bacillus subtilis</i>	12	14	17	33	ND	ND	ND

Résultat et discussion

ND : non déterminé

D'après les résultats obtenus, on constate que les deux extraits de myxobactéries ont présente une activité contre les bactéries testées.

L'extrait N°01 de l'isolat S16s MI a présente la plus forte activité avec un diamètre de zone d'inhibition de 18 mm a 50% et ceci contre *P.aeruginosa*, ainsi qu'une bonne activité qui s'est traduite par un diamètre de 17 mm a 75% contre *Bacillus*.

L'extrait N°02 de l'isolat S27s MIV a présente une bonne activité avec un diamètre de zone d'inhibition de 17 mm a 25% et ceci contre *Listeria monocytogenes*,

A l'exception, l'extrait N°01 de l'isolat S16s MI possède une activité importante contre *Bacillus subtilis* (33 mm) à 100% qui représente la plus grande zone d'inhibition du test.

V.9. La chromatographie sur couche mince (CCM)

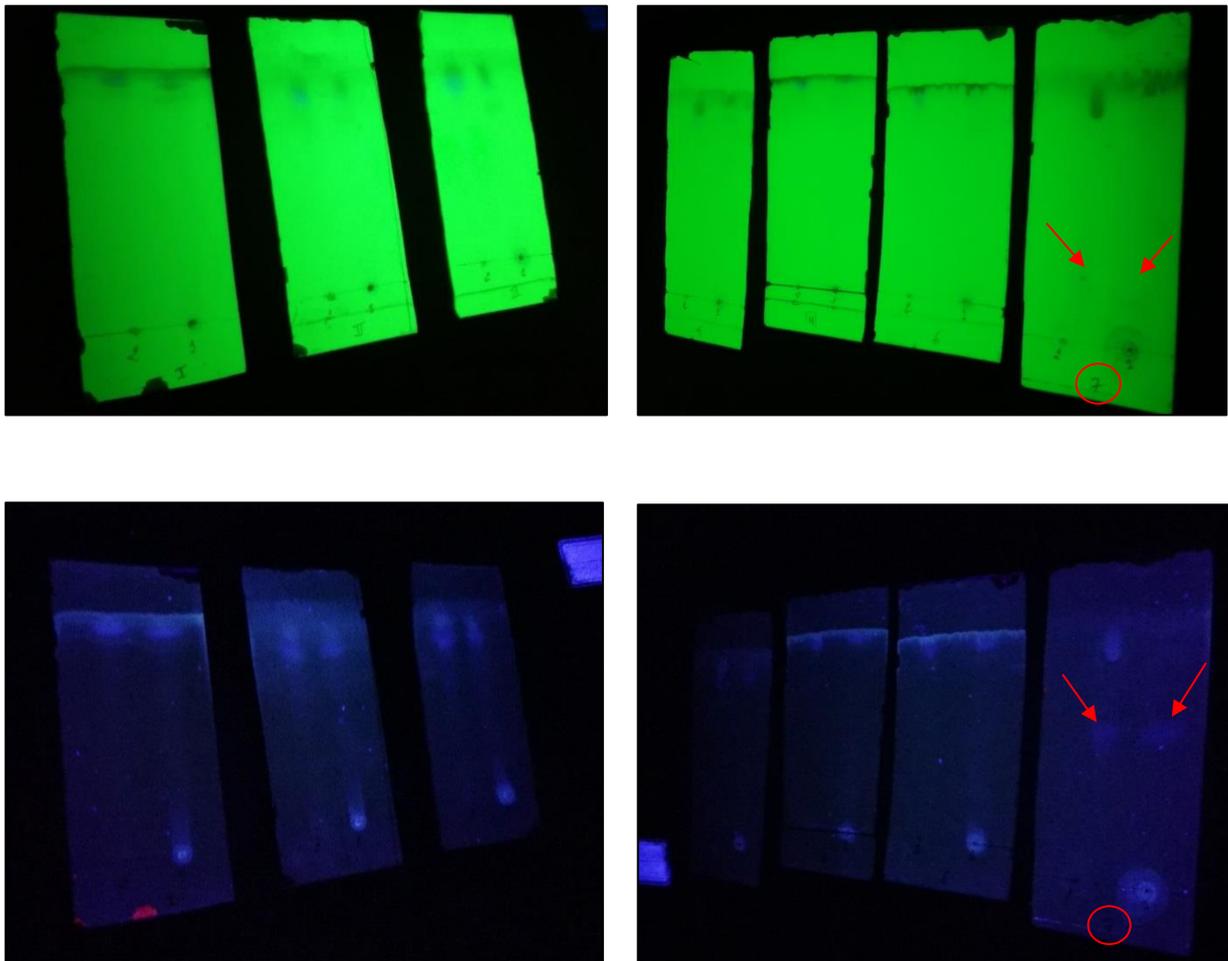


Figure 32 : Résultats de différents systèmes de séparation

On remarque que le système N°7 AcOET /MeOH: [9/1] nous donne trois (3) molécules pour chaque extrait, contrairement aux autres systèmes qui nous a donner deux (2) molécules pour chaque extrait.

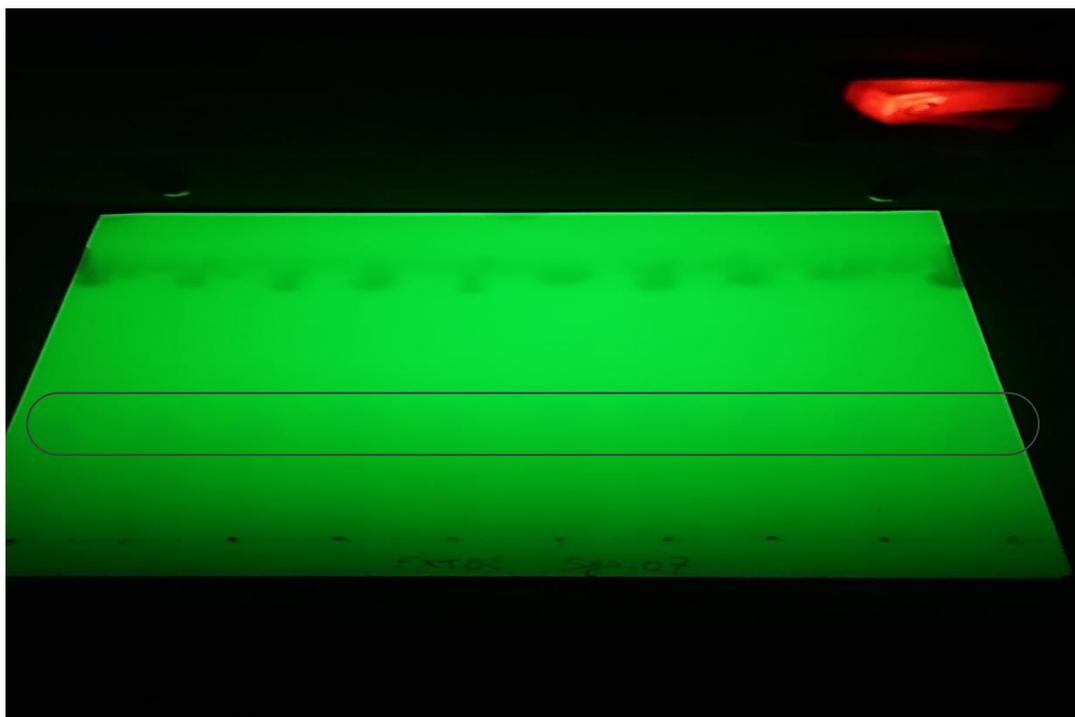


Figure 33 : Observation de la plaque CCM sous lampe U-V à 254 nm

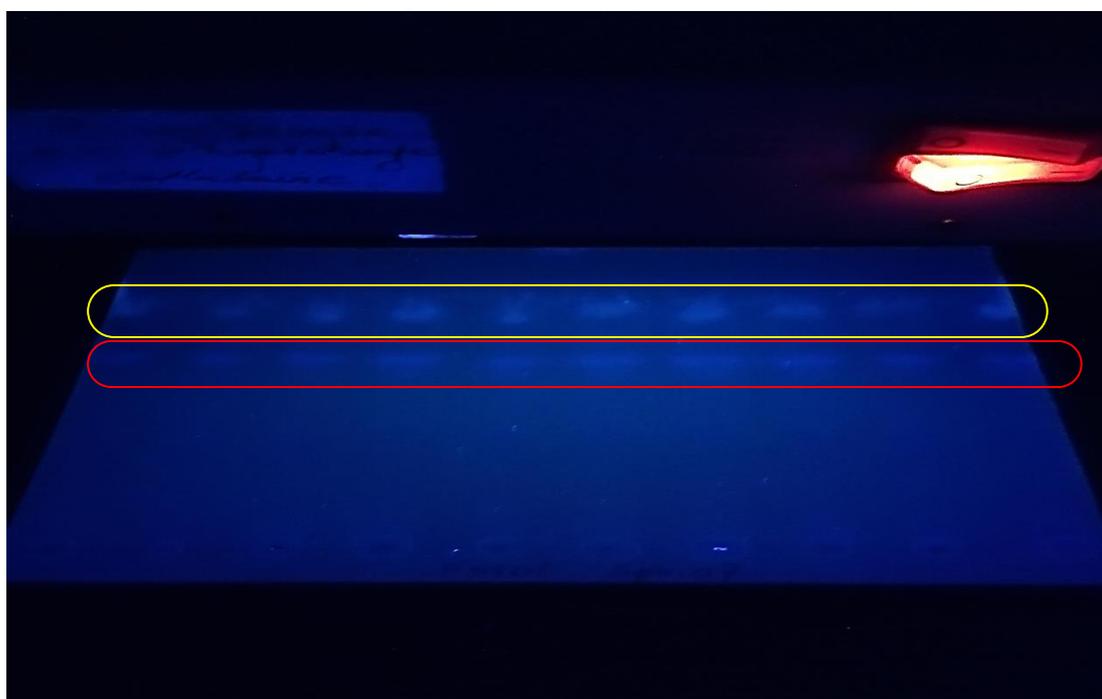


Figure 34 : Observation de la plaque CCM sous lampe U-V à 366 nm

Résultat et discussion

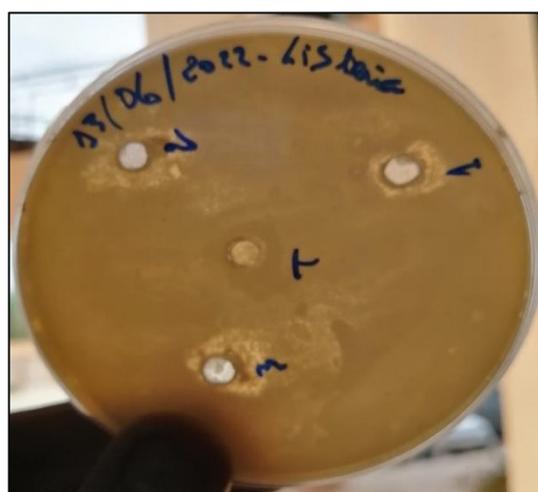
Tableau 9 : Référence frontale de chaque molécule

	Molécule 01	Molécule 02	Molécule 03
Distance parcourue (cm)	9.8	12.3	15.6
Référence frontale (rf)	0.56	0.7	0.89
Distance parcourue par le solvant	17.5cm		

V.10. Teste des extraits des molécules



Pseudomonas aeruginosa



Listeria monocytogenes

Figure 35 : Teste des extraits des molécules

Les fractions 1 et 3 qui ont respectivement le rf 0.56 et 0.89 ont montré une activité inhibitrice contre *Listeria monocytogenes* alors que pour *P.aeruginosa* seule la fraction 3 (0.89) a présenté un pouvoir inhibiteur important.

Le composant qui se trouve dans fraction 3 nécessite donc une identification chimique en utilisant des techniques chromatographiques et spectroscopiques tel que une chromatographie phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse, HPLC, RMN

VI. Conclusion

Conclusion

Les thérapies standards des infections dues aux souches multi résistantes n'ont devenue plus suffisantes, même les médicaments de 2ème et 3ème lignes ne sont pas assez actifs contre ces dernières. Il devient alors crucial de chercher de nouveaux composés bioactifs d'origine naturelle afin de stimuler continuellement la découverte et le développement des nouveaux médicaments.

D'après la littérature, il est clair qu'ils ont un effet antagoniste contre de nombreux agents pathogènes humains, végétaux et animaux. C'est pour cela le but principal de ce travail est l'isolement des souches de myxobactéries et la mise en évidence de leur pouvoir antimicrobienne.

Un totale de 19 isolats est obtenu à partir de quatre échantillons de sol rhizosphérique du différentes plantes (*Artemisia*, *Ziziphus*, *Pistacia lentiscous*) et deux échantillons de sédiments marins collectés de différentes zones de l'Algérie. A la base des résultats, le meilleur rendement est donné par les sédiments marins, en effet 6 isolats parmi les 19 sont actifs. Deux isolats (S16s MI et S27s MIV) sont retenus pour une fermentation et extraction des métabolites secondaires en se basant sur leurs pouvoirs inhibiteurs.

L'isolat S16s est obtenu par la méthode de papier filtre, qui permet d'isoler des myxobactéries cellulolytiques, alors que l'isolat S27s est obtenu par la méthode de *E coli* morte qui permet d'isoler des myxobactéries bactériolytiques, même la méthode de fumier de lapin c'est une méthode efficace pour isoler les souches myxobactériennes mais cette dernière à une difficulté de purification.

La caractérisation morphologique des isolats a révélé qu'ils sont des bactéries ayant une forme bacillaire, formants de corps fructifiés de différentes couleurs (blanches, orange, jaunes ...etc.) et donnent des colonies à aspect des essaims sur milieu solide ce qui est caractéristique des myxobactéries.

La mise en évidence de pouvoir antimicrobien prouve que les deux souches myxobactériennes purifier ont une activité inhibitrice sur :

E.coli, *Staphylococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas spp*, *Pseudomonas aeruginosa* , *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*.

La caractérisation préliminaire de l'extrait brut par CCM nous a permet de sélectionner la proportion des solvants adéquats de la phase mobile, il s'agit de l'acétate d'éthyle /méthanol (9/1). Cette technique a permet de séparer entre la fraction active et les autres composants de l'extrait brut.

Enfin, nos résultats, malgré qu'ils soient préliminaires, ils nous ouvrent une piste très intéressante dans la résolution du problème de l'antibio-résistance. Ce travail n'est donc qu'une contribution qui mérite d'être poursuivi en effectuant les travaux suivants :

Conclusion

- L'identification moléculaire des isolats intéressants.
- L'analyse HPLC-MS et/ ou CPG-MS des extraits actifs pour détecter les nouveaux composés et RMN pour élucider la structure.

VII. Résumé

Résumé

Les myxobactéries qui sont des bactéries à Gram négative appartiennent au groupe protéobactéries sont considérés comme une excellente source de métabolites bioactifs. Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à la recherche de ces microorganismes dans différents biotopes naturels de l'Algérie. Les échantillons sont prélevés à partir de deux sites pour les sédiments marins et de trois sols rhizosphérique des trois plantes *Ziziphus*, *Artemisia*, *Pistacia lentiscous*. L'isolement est effectué en utilisant quatre méthodes, les deux premières visent à rechercher les Myxobactéries cellulolytiques (méthode de papier filtre et méthode de fumier de lapin) alors que les deux autres visent la sélection des micro-prédateurs de ce groupe bactérien *Escherichia coli* vivante et morte. Les sédiments marins s'avèrent les plus riches en myxobactéries. Au total, 19 isolats myxobactériens sont obtenus sur différents échantillons et par différentes méthodes. Le screening primaire est réalisé par la technique de cylindres d'agar contre cinq bactéries indicatrices (*E coli*, *Pseudomonas* *Staphylococcus aureus* *MRSA*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*). Six isolats soit 31% sur 19 ont donné une activité antibactérienne. En se basant sur le spectre d'activité, deux isolats S16s MI et S27s MIV sont retenus pour réaliser une fermentation sur le milieu CY. La caractérisation préliminaire de l'extrait brut par CCM nous a permis de sélectionner la proportion des solvants adéquats de la phase mobile, il s'agit de l'acétate d'éthyle /méthanol (9/1). Cette technique a permis de séparer l'extrait en trois fractions. Le screening secondaire par la méthode des puits a montré que les deux extraits sont actifs sur les trois bactéries-test *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*. Les fractions 1 et 3 qui ont respectivement le rf 0.56 et 0.89 ont montré une activité inhibitrice contre *Listeria monocytogenes* alors que pour *P.aeruginosa* seule la fraction 3 (0.89) a présenté un pouvoir inhibiteur important.

Mots clés : Myxobactéries, Molécule bioactifs, Activité antibactérienne

VIII. Références bibliographiques

Liste de références

B

B. Kunze, H. Reichenbach, R. Müller, G. Höfle, J. Antibiot. 2005, 58 244-251.

Berkeley MJ. 1857. Introduction to cryptogamic botany (on Stigmatella and Chondromyces). London (UK): H. Bailliere Publishers. p. 313-5.

Brinkhoff T, Fischer D, Vollmers J, Voget S, Beardsley C, Thole S, ... Simon M. 2012. Biogeography and phylogenetic diversity of a cluster of exclusively marine myxobacteria. ISME J 6(6):1260-72.

Brockman, E. R., 1967. Fruiting myxobacteria from the South Carolina Coast. J. Bacteriol. 94:1253-1254.

Baur E. (1905) Myxobakterien-Studien. Arch. Protistenk.5, 92–121.

B. Shen, Sci STKE 2004, 2004 e14

C

Couke P Voëts JP (1967) Les besoins en minéraux de *Polyangium cellulorum*. Z.Allg. Microbiol.7, 175–182.

D

Dworkin, M. (1966). Biology of the myxobacteria. Annu Rev Microbiol V20, P75-106

Demain, A. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol V52, P455–463.

Dworkin, M. (1984). Research on the myxobacteria: past, present, future. In Rosenberg E ed Myxobacteria development and cell interactions, Springer-Verlag, (New York Inc), pp. 221-222.

Dawid, W. (2000). Biology and global distribution of myxobacteria in soils. FEMS Microbiol Rev V24, P403-427.

Dawid, W. 1984. Myxobakterien in ungestorten Hochmooren des Hoben Venn (Hautes Fagnes, Belgien). Syst. Appl. Microbiol. 5:555-563.

Dawid, W. 1978. Fruchtkörper-bildende Myxobakterien in böden Brasiliens. Zschr. Allgem. Mikrobiol. 18:83-93.

Dawid, W. 1979. Vorkommen und Verbreitung Fruchtkörperbildender Myxobakterien im Siebengebirge. Zschr. Allgem. Mikrobiol. 19:705-719.

Dworkin M. (1969) Sensitivity of gliding bacteria to actinomycin D. *J. Bacteriol.*98, 851–852.

F

F. Sasse, H. Steinmetz, J. Heil, G. Höfle, H. Reichenbach, J. Antibiot. 2000, 53 879- 885.

F. Sasse, B. Kunze, T. M. Gronewold, H. Reichenbach, J. Natl. Cancer Inst. 1998, 90 1559-1563.

F. Sasse, B. Böhlendorf, M. Herrmann, B. Kunze, E. Forche, H. Steinmetz, G. Höfle, H. Reichenbach, M. Hermann, J. Antibiot. 1999, 52 721-729.

Fudou R, Jojima Y, Iizuka T, Yamanaka S. 2002. *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov.: Novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments. J Gen Appl Microbiol 48(2):109-15.

Findlay, B.L. (2016). The chemical ecology of predatory soil bacteria. ACS Chem Biol V11, P1502-1510.

Felder, S.; Dreisigacker, S.; Kehraus, S.; Neu, E.; Bierbaum, G.; Wright, P.R.; Menche, D.; Schäberle, T.F.; König, G.M. Salimabromide: Unexpected chemistry from the obligate marine myxobacterium *Enhygromxya salina*. Chem. Eur. J. 2013, 19, 9319–9324.

G

G. Hagelueken, S. C. Albrecht, H. Steinmetz, R. Jansen, D. W. Heinz, M. Kalesse, W. D. Schubert, Angew Chem Int Ed Engl 2009, 48 595-598.

G. Thierbach, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle, Biochim. Biophys. Acta 1984, 765 227-235. [69.]

Garcia, R.O., Krug, D., Muller, R. (2009). Discovering natural products from myxobacteria with emphasis on rare producer strains in combination with improved analytical methods. Methods Enzymol V458, P59-91.

Goldman, B. S., Nierman, W. C., Kaiser, D., Slater, S. C., Durkin, A. S., Eisen, J. A., et al. (2006). Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 15200–15205. doi: 10.1073/pnas.0607335103.

Garcia, R.O. (2011). Exploiting the natural products of novel myxobacteria: Phylogenetic and fatty acid perspectives and bioactive compound discovery. Thèse doctorat, université de la Saare, Sarrebruck, pp. 1-11.

Garcia, R.; La Clair, JJ; Müller, R. Orientations futures de la découverte de produits naturels myxobactériens marins déduite de la métagénomique. Mar. Drug 2018 , 16 , 303.

H

H. Reichenbach, G. Höfle, in Scientific Annual Report, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig 1994, p. pp. 5-22.

H. F. Vahlensieck, L. Pridzun, H. Reichenbach, A. Hinnen, Curr. Genet. 1994, 25 95- 100.

H. Steinmetz, H. Irschik, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle, R. Jansen, Chemistry 2007, 13 5822-5832.

H. Irschik, H. Reichenbach, G. Höfle, R. Jansen, J. Antibiot. 2007, 60 733-738.

H. Irschik, R. Jansen, G. Höfle, K. Gerth, H. Reichenbach, J. Antibiot. 1985, 38 145- 152.

H. Irschik, R. Jansen, K. Gerth, G. Höfle, H. Reichenbach, J. Antibiot. 1987, 40 7-13.

H. Irschik, H. Reichenbach, J. Antibiot. 1985, 38 1237-1245.

Hou PB, Li YZ, Wu BH, Yan ZC, Yan BX, Gao PJ. 2006. Cellulolytic complex exists in cellulolytic myxobacterium Sorangium. Enzyme Microb Technol 38(1-2):273-8.

Hook, L. A. 1977. Distribution of myxobacters in aquatic habitats in an alkaline bog. Appl. Environ. Microbiol. 34:333-335.

H. G. Menzella, C. D. Reeves, Curr. Opin. Microbiol. 2007, 10 238-245

I

I. Nিকেলেইট, S. Zender, F. Sasse, R. Geffers, G. Brandes, I. Sørensen, H. Steinmetz, S. Kubicka, T. Carlomagno, D. Menche, I. Gütgemann, J. Buer, A. Gossler, M. P. Manns, M. Kalesse, R. Frank, N. P. Malek, Cancer Res. 2008, 14 23-35

Iizuka T, Jojima Y, Fudou R, Tokura M, Hiraishi A, Yamanaka S. 2003a. *Enhygromyxa salina* gen. nov., sp. nov., a slightly halophilic myxobacterium isolated from the coastal areas of Japan. 2003. Syst Appl Microbiol 26(2):189-96.

Iizuka T, Jojima Y, Fudou R, Hiraishi A, Ahn JW, Yamanaka S. 2003b. *Plesiocystis pacifica* gen. nov., sp. nov., a marine myxobacterium that contains dihydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coasts of Japan. Int J Syst Evol Microbiol 53(1):189-95.

Iizuka T, Jojima Y, Hayakawa A, Fujii T, Yamanaka S, Fudou R. 2013. *Pseudenhygromyxa salsuginis* gen. nov., sp. nov., a myxobacterium isolated from an estuarine marsh. Int J Syst Evol Microbiol 63(4):1360-9.

Iizuka, T.; Jojima, Y.; Hayakawa, A.; Fujii, T.; Yamanaka, S.; Fudou, R. *Pseudenhygromyxa salsuginis* gen. nov., sp. nov., une myxobactérie isolée d'un marais estuarien. *Int. J. Syst. Évol. Microbiol.* **2013**, 63, 1360–1369.

J

James E. Berleman, John R. Kirby. (2009) Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 33, Issue 5, September 2009, Pages 942–957, doi : 10.1111/j.1574-6976.2009.00185.x

K

K. Gerth, H. Irschik, H. Reichenbach, W. Trowitzsch, J. Antibiot. 1980, 33 1474-1479.

Krop, J., Vela Gurovic, M.S., Nett, M. (2016). Antibiotics from predatory bacteria. Beilstein J Org Chem V12, P594-607.

Karamanos, Y., Singer, M., Sjøgaard-Andersen, L. (1999). 25th International conference on the biology of the myxobacteria. Mol Microbiol V31, P1863-1869.

Kühlwein, H. 1960. Zur Systematik und Verbreitung der Myxobakterien. Zbl. Bakteriol., 2. Abt. 113:480-490.

Krzemieniewska, H., and S. Krzemieniewski. 1927b. Rozsiedlenie miksobakteryj (Über die Verbreitung der Myxobakterien im Boden). (In Polish, with German summary.) *Acta Soc. Botan. Polon.* 5:102-139.

Kaiser, D. (2004). Signaling in myxobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 75–98. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123620.

K. J. Weissman, R. Müller, *Bioorg.Med.Chem.* 2009, 17 2121-2136. Et M. Nett, G. M. König, *Nat.Prod.Rep.* 2007, 24 1245-1261.

Kumar, V., Bharti, A., Gupta, V.K., Gusain, O., Bisht, G.S. (2012). Actinomycetes from solitary wasp mud nest and swallow bird mud nest: isolation and screening for their antibacterial activity. *World J Microbiol Biotechnol* V28, P871-880.

L

L. Pridzun, F. Sasse, H. Reichenbach, in *Antifungal agents* Eds.: G. K. Dixon, C. L.G., D. W. Hollomon), BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK 1995, p. pp. 99-109.

Link, H.F. (1809). Observations in ordines plantarum naturales In Landwehr, W., Wolf, C., Wink, J. (2016). Actinobacteria and Myxobacteria—two of the most important bacterial resources for novel antibiotics. *Curr Top Microbiol Immunol* V398, P273-302.

Ludwig, W., HH Schleifer, H. Reichenbach et E. Stackebrandt. 1983 Une analyse phylogénétique des myxobactéries *Myxococcus fulvus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Cystobacter fuscus*, *Sorangium cellulosum* et *Nannocystis exedens* *Arch. Microbiol.* 135 58–62.

M

M. W. Khalil, F. Sasse, H. Lünsdorf, Y. A. Elnakady, H. Reichenbach, *ChemBioChem* 2006, 7 678-683.

Menne, B., and G. Rückert. 1988. Myxobakterien (Myxo-bacterales) in Hohlensedimenten des Hagengebirges (Nordliche Kalkalpen). *Die Hohle* 4:120-131.

McCurdy, H. D. 1969a. Studies on the taxonomy of the Myxobacterales. I. Record of Canadian isolates and survey of methods. *Can. J. Microbiol.* 5:1453-1461.

Michoustine, E. (also: Mishustin). 1968. Microorganismes cellulolytiques des sols de L'U.S.S.R. *Ann. Inst. Pasteur* 115:596-603.

Mohr, K.I. (2018). Diversity of myxobacteria—we only see the tip of the iceberg. *Microorganisms* V6, P84.

Mauriello, E. M. F., Mignot, T., Yang, Z., and Zusman, D. R. (2010). Gliding motility revisited: how do the myxobacteria move without flagella? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 229–249. doi: 10.1128/MMBR.00043-09

Mohr, K.I. (2018). Diversity of myxobacteria—we only see the tip of the iceberg. *Microorganisms* V6, P84.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A. (2015). *Brock biology of microorganisms*. Pearson, (USA), pp. 462-465.

McCurdy H.D. (1969) Studies on the taxonomy of the Myxobacterales. I. Record of Canadian isolates and survey of methods. *Can. J. Microbiol.* 5, 1453–1461.

N

Noren, B. 1950. Notes on myxobacteria in Sweden. *Svensk Bot. tidskr.* 44: 108-112.

Noren, B. 1952. Further notes on the distribution of myxobacteria in Swedish soils. *Svensk Bot. Tidskr.* 46:446-453.

Nan, B., and Zusman, D. R. (2011). Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria. *Annu. Rev. Genet.* 45, 21–39. doi: 10.1146/annurev-genet110410-132547

Nariya, H., and Inouye, M. (2008). MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* 132, 55–66. doi: 10.1016/j.cell.2007

Nariya, H., and Inouye, M. (2008). MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* 132, 55–66. doi: 10.1016/j.cell.2007

O

O'Connor, K. A., and Zusman, D. R. (1991a). Development in *Myxococcus xanthus* involves differentiation into two cell types, peripheral rods and spores. *J. Bacteriol.* 173, 3318–3333.

O'Connor, K. A., and Zusman, D. R. (1991b). Behavior of peripheral rods and their role in the life cycle of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 173, 3342–3355.

Oyaizu, H., et CR Woese. (1985) Relations phylogénétiques entre les bactéries respiratoires sulfatées, les myxobactéries et les bactéries pourpres *Syst. Appl. Microbiol.* 6 257–263

Ohlendorf, B.; Leyers, S.; Krick, A.; Kehraus, S.; Wiese, M.; König, G.M. Phenylannolones A–C: Biosynthesis of new secondary metabolites from the myxobacterium *Nannocystis exedens*. *ChemBioChem* 2008, 9, 2997–3003.

P

-Peterson, J. E. 1965. A group of strongly cellulolytic myxobacteria previously unreported in North American soils. *Am. J. Bot.* 52:636.

-Peterson, J. E., and B. Noren. 1967. The occurrence of the cellulose-decomposing myxobacterium, *Sorangium cellulosum*, in Scandinavian soils. *Am. J. Bot.* 54:648.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Braña, A. F., Shimkets, L. J., Sevillano, L., and Santamaría, R. I. (2011). *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microb. Biotechnol.* 4, 175–183. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00208.x

Pérez, J., Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, FJ et Muñoz-Dorado, J. (2016). Prédation bactérienne : 75 ans et ça compte ! *Environ. Microbiologie* 18, 766–779. doi : 10.1111/1462-2920.13171

R

R. Jansen, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle, *Eur.J.Org.Chem.* 2003, 2684-2689.

R. Müller, K. Gerth, J. *Biotechnol.* 2006, 121 192-200.

Reichenbach, H. (2001). Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J Ind Microbiol Biotechnol* V27, P149–156.

Rosenberg, E., Varon, M. (1984). Antibiotics and lytic enzymes. In Rosenberg E ed *Myxobacteria development and cell interactions*, Springer-Verlag, (New York Inc), pp. 109- 111.

Rückert, G. 1981. Myxobakterien (Myxobacterales) auf Blattoberflächen. *Zschr. Allgem. Mikrobiol.* 21:761-763.

Rückert, G. 1983. Myxobakterien in Boden extremer Bio- tope. *Mitt. deutsch. Bodenkundl. Gesellsch.* 38:355-360.

Ruckert, G. 1975a. Zur Verbreitung bakteriotropher Myxo-bakterien in Waldboden. *Mitteilungen des Vereins für forstliche Standortskunde und Forstpflanzenzuchtung.* Heft 24:43-47.

Rückert, G., and G. Heym. 1977. Bakteriotrophe Myxo-bakterien (Myxobacterales) in ariden Substraten. *Karlsruher Geographische Heft* 8: 101-111.

Ruckert, G. 1976. Myxobakterien (Myxobacterales) in natürlichen und naturnahen Substraten aus der europäischen Subarktis. *Acta Bot. Islandica* 4:4-9.

Ruckert, G. 1979. Myxobakterien-Artenspektren von Boden in Abhängigkeit von bodenbildenden Faktoren unter besonderer Berücksichtigung der Bodenreaktion. *Zschr. Pflanzenernähr. Bodenk.* 42:330-343.

Reichenbach, H. (2005). Myxococcales. In Brenner DJ, Krieg NR, Staley TJ, Garrity GM ed *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer, (USA), vol 2, Part C, pp. 1059-1071.

Reichenbach, H. (1993) Biology of the myxobacteria: Ecology and taxonomy. In: *Myxobacteria II* (Dworkin, M. and Kaiser, D., Eds.), pp. 13–62. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Reichenbach, H. et Dworkin, M. (1991) Les myxobactéries. Dans : *The Prokaryotes* (Starr, KP, Stolp, H., Trüper, HG, Belows, A. et Schlegel, HG, Eds.), Vol. 4, p. 3415–3487. Springer, New York.

Revermann, O. (2012). Novel secondary metabolites from myxobacteria and their biosynthetic machinery. Thèse doctorat, université de la Saare, Sarrebruck, pp.1-5.

R.O. Garcia, D. Krug, R. Müller, *Methods Enzymol.* 2009, 458 59-91. Et K. J. Weissman, R. Müller, *Nat.Prod.Rep.* 2010, 27 1276-1295.

S

Shimkets LJ, Dworkin M, Reichenbach H. 2006. The myxobacteria. In: Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes Vol 7 — Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses.* New York (US): Springer-Verlag. p. 31-115.

Singh BN. 1947. Myxobacteria in soils and composts; their distribution, number and lytic action on bacteria. *J Gen Microbiol* 1(1): 1-10.

Sabados-Saric, A. 1957. Istraživanja o miksobakterijama u tihina Jugoslavije (Myxobacteria in

different types of soils in Yugoslavia). (In Serbo-Croatian, with English summary.)
Yugoslavenska Akademija Znanosti I Umjetnosti, Zagreb 312:5-n29.

Shimkets, L.J., Dworkin, M., Reichenbach, H. (2006). The myxobacteria. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E ed The prokaryotes, Springer, (New York), vol 7, pp. 39-59.

Shimkets, L. J. (1986a). Correlation of energy-dependent cell cohesion with social motility in *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 166, 837–841.

Shimkets, L. J. (1986b). Role of cell cohesion in *Myxococcus xanthus* fruiting body formation. J. Bacteriol. 166, 842–848.

Stackebrandt, E., Murray, R.G.E., Trüper, H.G. (1988). Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. Int J Syst Bacteriol V38, P321–325.

Sun, Y.; Tomura, T.; Sato, J.; Iizuka, T.; Fudou, R.; Ojika, M. Isolation and biosynthetic analysis of haliamide, a new PKS-NRPS hybrid metabolite from the marine myxobacterium *Haliangium ochraceum*. Molecules 2016, 21, 59.

Shimkets LJ, Dworkin M, Reichenbach H. 2006. The myxobacteria. In: Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. The Prokaryotes Vol 7 — Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. New York (US): Springer-Verlag. p. 31-115.

Singh B.N. (1947) Myxobacteria in soils and composts; their distribution, number and lytic action on bacteria. J. Gen. Microbiol.1, 1–10

Shimkets, LJ (1984) Nutrition, métabolisme et initiation du développement. Dans : Myxobactéries. Développement et interactions cellulaires (Rosenberg, E., Ed.), pp. 91–107. Springer, New York.

T

T. M. Gronewold, F. Sasse, H. Lunsdorf, H. Reichenbach, Cell Tissue Res 1999, 295 121-129.

Thaxter ,R. (1892). On the myxobacteriaceae, a new order of schizomycetes. Bot Gaz V17, P389–406.

Tomura, T.; Nagashima, S.; Yamazaki, S.; Iizuka, T.; Fudou, R.; Ojika, M. An unusual diterpene-enhygromic acid and deoxyenhygrolides from a marine myxobacterium, *Enhygromyxa* sp. Mar. Drugs 2017, 15, 109.

W

W. Trowitsch, L. Witte, H. Reichenbach, FEMS Microbiol.Lett. 1981, 12 257-260.

White, D. (1984). Structure and function of myxobacteria cells and fruiting bodies. In Rosenberg E ed Myxobacteria development and cell interactions, Springer-Verlag, (New York) Inc, pp. 52-64.

Wireman, J. W., and Dworkin, M. (1977). Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 129, 798–802.

Wenzel, S.C., Muller, R. (2007). Myxobacterial natural product assembly lines: fascinating

examples of curious biochemistry. *Nat Prod Rep* V24, P1211-1224.

Weissman, K.J., Muller, R. (2010). Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action. *Nat Prod Rep* V27, P1276-1295.

Weissman, K.J., Muller, R. (2009). A brief tour of myxobacterial secondary metabolism. *Bioorg Med Chem* V17, P2121-2136.

X

Xie, Z-P., Xu, Z-N., Shen, W-H., Cen, P-L. (2005). Bioassay of mildiomycin and a rapid, cost-effective agar plug method for screening high-yielding mutants of mildiomycin. *World J Microbiol Biotechnol* V21, P1433–1437.

Y

Y. Shen, S. L. Volrath, S. C. Weatherly, T. D. Elich, L. Tong, *Mol.Cell* 2004, 16 881- 891. [68.]
Y. A. Elnakady, F. Sasse, H. Lünsdorf, H. Reichenbach, *Biochem.Pharmacol.* 2004, 67 927-935.

Z

Zhang YQ, Li YZ, Wang B, Wu ZH, Zhang CY, Gong X, ... Zhang Y. 2005. Characteristic and living patterns of marine myxobacterial isolates. *Appl Environ Microbiol* 71(6):3331-6.

VIII. Annexe

Les milieux de culture

Stan21-agar

Solution A :

- K_2HPO_41,0 g
- Extrait de levure.....0,02 g
- Agar.....10 g

Ajoutez environ deux tiers de l'eau distillée (environ 700 ml).

Solution B:

- KNO_31,0 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$1,0 g
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$1,0 g
- $FeCl_3$0,2 g
- $MnSO_4 \cdot 7H_2O$0,1 g

Ajoutez le reste du volume de l'eau distillée(300ml), ajuster le pH de chaque solution à 7,2 puis autoclavez séparément.

Water-agar

- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$1 g
 - Agar.....18 g
 - Eau distillée.....1000 ml
- ajuster le pH à 7,2

cv-agar

casitone..... 3g
 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$1,36g
Extrait de levure 1g
Agar 18g
Eau distillée.....1000ml
ajuster le pH à 7,2

LB-liquide

Tryptone.....10g
Extrait de levure.....5g
Nacl10g
Eau distillée1000 ml
ajuster le pH à 7,2