

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

FACULTÉ DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION

DOCTORALE EN SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ ET ENVIRONNEMENT

UNITÉ DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCE DE LA VIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

CENTER FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES
IN LIFE, HEALTH AND
ENVIRONMENTAL SCIENCE

RESEARCH AND DOCTORATE
TRAINING UNIT IN LIFE SCIENCE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE / *MICROBIOLOGY LABORATORY*

**Activité antibactérienne et anti biofilm
des extraits aqueux de *Streptomyces*
spp. vis-à-vis de *Vibrio* spp. isolés de
*Clarias gariepinus***

Mémoire rédigé et présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

OPTION : Microbiologie Alimentaire et industrielle

Par :

YAP NGUISSOUCK Mariama Liza

Matricule : 18B2469

Licence en Microbiologie

Sous l'encadrement de :

NKOUDOU ZE Nardis

Chargé de Cours

Université de Yaoundé I



Année académique 2024/2025

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

FACULTÉ DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION

DOCTORALE EN SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ ET ENVIRONNEMENT

UNITÉ DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCE DE LA VIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

CENTER FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES
IN LIFE, HEALTH AND
ENVIRONMENTAL SCIENCE

RESEARCH AND DOCTORATE
TRAINING UNIT IN LIFE SCIENCE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE / MICROBIOLOGY *LABORATORY*

**Activité antibactérienne et anti biofilm
des extraits aqueux de *Streptomyces*
spp. vis-à-vis de *Vibrio* spp. isolés de
*Clarias gariepinus***

Mémoire rédigé et présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

OPTION : Microbiologie Alimentaire et industrielle

Par :

YAP NGUISSOUCK Mariama Liza

Matricule : **18B2469**

Licence en Microbiologie

Sous l'encadrement de :

NKOUDOU ZE Nardis

Chargé de Cours

Université de Yaoundé 1

Année académique : 2024/2025

DÉDICACE

À

Mes parents

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie. Tout d'abord j'aimerais remercier le créateur divin pour la force et le courage, la détermination et la santé pour la réalisation de ce travail. Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui de près ou de loin ont participées pour atteindre cet objectif.

Je tiens à adresser mon sincère remerciement :

- ✚ À mon encadreur **Docteur NKOUDOU ZE Nardis** merci d'avoir accepté de m'encadrer. Votre rigueur et vos conseils ont contribué à l'élaboration de ce travail. Merci pour votre soutien sur toutes les formes, pour votre accompagnement, vos encouragements vis-à-vis de ma personne sans cesse tout au long de ce travail.
- ✚ Au chef du département de Microbiologie de l'université de Yaoundé 1 **Pr. ESSIA NGANG Jean Justin**.
- ✚ Aux enseignants du département de Microbiologie pour leurs enseignements et leur suivi dans l'application des notions, du savoir-faire et du savoir être.
- ✚ Au **Dr. BONNY** Patrice pour m'avoir initié aux techniques de laboratoire d'analyse de Microbiologie alimentaire.
- ✚ Au laboratoire de Microbiologie de l'université de Yaoundé 1 pour le plateau technique.
- ✚ Au doctorant **Mr. BEBINE BIEDI Olivier** pour sa disponibilité, pour son suivi sur la paillasse jusqu'à la correction du document. Pour les conseils qui ont contribué à l'amélioration de ce travail.
- ✚ À toute l'équipe de recherche du laboratoire de Microbiologie : Doctorants, Aîné académique en Particulier **Mr. ZE ABADA Loic** dont l'assistance, et le dévouement m'a été d'une grande aide. Je ne pourrai oublier Mr. **GODWE Joel** qui m'a tenu la main pendant mes débuts, et m'a prodigué des conseils essentiels pour l'avancement de mon travail, et à mes camarades de la 8^{ème} promotion, pour leur familiarité et pour tous les bons et mauvais moments passés durant tout le processus de recherche.
- ✚ Je remercie également **Mr. BALEBA BATEBGA Jean Émile** pour son soutien indéfectible, ses encouragements, ses conseils qui ont été d'un grand soutien durant la recherche.

SOMMAIRE

DÉDICACE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
SOMMAIRE	iii
RÉSUMÉ.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX	x
INTRODUCTION	1

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

1.1. GÉNÉRALITÉ SUR LE POISSON D’EAU DOUCE	2
1.1.1 Description et classification des poissons d’eau douces.....	2
1.1.2 Mode d’alimentation des poissons d’eau douce	3
1.1.2.1Aliments naturels et aliments supplémentaires	3
1.1.3 Cas d’espèce de <i>Clarias gariepinus</i>	3
1.1.3.1 Classification.....	3
1.1.3.2 Morphologie de <i>Clarias gariepinus</i>	3
1.1.3.3 Alimentation de <i>Clarias gariepinus</i>	4
1.1.3.4 Intérêt économique et nutritionnel de <i>Clarias gariepinus</i>	4
1.1.4 Place de la pisciculture au Cameroun.....	5
1.1.5 Problèmes liés à la survie du poisson en pisciculture	5
1.2. GÉNÉRALITÉS SUR LE PATHOGENE BACTÉRIEN DU POISSON D’EAU DOUCE... ..	6
1.2.1 Description et classification.....	6
1.2.1.1 Description	6
1.2.1.2 Classification.....	7
1.2.2 Causes et manifestations de la maladie bactérienne (vibrioses)	7
1.2.3 Risques associés à la présence de <i>Vibrio</i> en pisciculture.....	8
1.3. GÉNÉRALITÉS SUR LES BIOFILMS	8
1.3.1 Définition	8
1.3.2. Composition et écologie inter membranaire des biofilms	9

1.3.3.	Mécanisme de formation	9
1.3.4.	Propriétés de résistance des biofilms.....	11
1.3.5.	Conséquence de la présence des biofilms en pisciculture	11
1.3.6.	Gestion de la formation des biofilms en pisciculture	12
1.4.	GÉNÉRALITÉS SUR LES <i>STREPTOMYCES</i>	13
1.4.1.	Description et classification.....	13
1.4.2.	Intérêt de <i>Streptomyces</i>	14
1.4.3.	Caractères morphologiques	14
1.4.4.	Caractères culturels	15
1.4.5.	Production des antimicrobiens par les <i>Streptomyces</i>	16

CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET METHODES

2.1	MATÉRIEL.....	17
2.1.1.	Matériel biologique	17
2.1.2.	Matériel du laboratoire	17
2.1.3.	Milieux de culture	17
2.1.4.	Réactifs.....	17
2.1.5.	Appareils.....	18
2.2	MÉTHODES	18
2.2.1	Évaluation de la capacité de formation des biofilms par les isolats de <i>Vibrio spp.</i>	18
2.2.1.1	Échantillonnage de l'espèce <i>Clarias gariepinus</i> et isolement de <i>Vibrio spp.</i>	18
2.2.1.2	Caractérisation microscopique et biochimique des espèces du genre <i>Vibrio</i>	19
2.2.1.3	Formation des biofilms par les différents isolats de <i>Vibrio</i>	20
2.2.2	Criblage de <i>Streptomyces spp.</i> capables d'inhiber <i>Vibrio</i>	21
2.2.2.1	Revivification et purification des isolats de <i>Streptomyces</i>	21
2.2.2.2	Évaluation de l'activité antagoniste des isolats de <i>Streptomyces</i> vis-à-vis de <i>Vibrio</i>	22
2.2.3	Évaluation de l'activité anti biofilm des extraits aqueux des isolats de <i>Streptomyces</i> . .	22
2.2.3.1	Production des extraits aqueux des isolats de <i>Streptomyces</i>	22
2.2.3.2	Détermination de la concentration minimale inhibitrice.	22
2.2.3.3	Évaluation de l'activité anti biofilm.....	23

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1	RÉSULTATS.....	24
3.4.1.	Caractéristiques des isolats du genre <i>Vibrio spp.</i> isolés de <i>Clarias gariepinus</i>.....	24
3.4.1.1.	Caractéristiques macroscopiques.....	24
3.4.1.2.	Caractéristiques microscopiques.....	24
3.4.1.3.	Caractéristiques biochimiques	24
3.1.1.4	Formation de biofilms de <i>Vibrio spp.</i>	26
3.4.2.	Activité antibactérienne de quelques isolats de <i>Streptomyces</i> vis-à-vis de l'isolat I₃G....	26
3.1.3	Activité bactéricide de l'extrait aqueux sur milieu solide vis-à-vis de l'isolat I₃G (détermination des CMI)	27
3.1.3.1	Activité des extraits aqueux de <i>Streptomyces</i> vis-à-vis des biofilms de l'isolat I₃G.	28
3.2	DISCUSSION.....	29
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	32
	CONCLUSION.....	32
	PERSPECTIVES.....	33
	ANNEXES	41

RÉSUMÉ

La pisciculture est un secteur d'activité important dans l'environnement camerounais, car elle contribue à la sécurité alimentaire et stimule le développement économique et social. Le poisson constitue environ 9,5% des besoins alimentaires (car riches en protéines) des populations camerounaises. Toutefois, il est sujet d'exposition à de nombreux contaminants à l'instar des bactéries du genre *Vibrio* avec une particularité de production de biofilms résistants ; ce qui augmente les risques de contamination alimentaires ou d'infections cutanées et de septicémies chez le poisson. Ce travail avait pour objectif général, d'évaluer l'activité antibactérienne et anti biofilm des extraits aqueux des *Streptomyces spp* vis-à-vis des *Vibrio spp.* contaminants l'espèce *Clarias gariepinus*. Pour se faire, deux *Vibrio spp.* ont été isolés de *Clarias gariepinus* ensuite caractérisés et soumis à l'activité inhibitrice des extraits de douze (12) isolats de *Streptomyces spp*.

Les résultats obtenus montrent que deux isolats de *Vibrio* s'apparentant aux espèces de *Vibrio cholerae* (I₃G) et *Vibrio vulnificus* (I₁V) sur la base de leurs caractéristiques macroscopiques et leurs traits biochimiques, contaminent principalement l'espèce *Clarias gariepinus*. Chacun des isolats produisant le maximum de biofilm le 5^{ème} jour de culture avec une production plus importante pour l'espèce I₃G. Sur les douze (12) extraits de *Streptomyces spp.* testés, six (06), ont pu inhiber la croissance *in vitro* de l'espèce I₃G ; Bel-12 et Ker-2 ayant produit des diamètres d'inhibition respectifs de 24,0±1.4 mm et 23,5±2,1 mm. Les extraits aqueux de ces isolats ont relevé que seul l'extrait de Ker-2 à partir de la concentration de 0,05 ml d'extrait /ml de milieu permet d'inhiber la formation du biofilm de l'espèce I₃G ; Bel-12 étant incapable de le faire aux concentrations testées. Ce travail montre ainsi qu'en utilisant les extraits de *Streptomyces spp.* dans l'élevage du poisson on peut réduire la formation des biofilms chez l'espèces *Clarias gariepinus* et réduire ainsi les risques de vibriose chez ce dernier.

Mots clés ; *Vibrio spp.* , *Clarias gariepinus*, biofilms, *Streptomyces spp.*, pisciculture

ABSTRACT

Fish farming is a significant activity in Cameroon, as it contributes to food security and stimulates both economic and social development. This form of aquaculture is particularly important because fish constitute approximately 9.5% of food needs of Cameroonian populations. However, it is also susceptible to numerous contaminants, like bacteria of *Vibrio* species with a specific characteristic of developing resistant biofilms. These biofilms increase the risks of alimentary infections or cutaneous and septicemic diseases in fish. This study aimed to evaluate the antimicrobial and anti-biofilm activity of *Streptomyces spp.* extracts against *Vibrio spp.* isolated from *Clarias gariepinus*. To achieve this, *Vibrio spp.* was isolated from *Clarias gariepinus*, then characterized and subjected to the inhibitory activity of twelve (12) *Streptomyces spp.* isolates.

The results obtained show that presumptive *Vibrio* species, appearing as *Vibrio cholera* (I₃G) and *Vibrio vulnificus* (I₁V) based on their macroscopic characteristics and biochemical traits, contaminates *Clarias gariepinus*. Each of the isolates produced maximum biofilm on the 5th day of culture with significant I₃G production. Amongst the twelve (12) *Streptomyces spp.* extracts tested, only six (06) could inhibit the in vitro growth of *Vibrio* I₃G; Bel-12 and Ker-2 were the most active, with inhibition diameters of 24,0±1.4 mm and 23,5±2,1 mm respectively. The aqueous extracts of these isolates also revealed that the Ker-2 extract, at a concentration of 0,05ml extract /ml, permitted the inhibition of biofilm formation by I₃G; Bel-12 extracts were incompetent at tested concentrations. This work highlights that using *Streptomyces spp.* extracts in fish farming could reduce the formation of biofilms in *Clarias gariepinus* and thereby decrease the risks of vibriosis in this sector.

Keywords ; *Vibrio spp.* , *Clarias gariepinus*, biofilms, *Streptomyces spp.*, pisciculture

LISTES DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES

ADN : Adénosine Dinucléotide

D.O: Densité optique

FAO: Food and Agriculture Organization

NaCl: Chlorure de sodium

ONPG : Orthonitrodiphosphate β -Galactopyranoside

sp : sous espèces

EPS : Extracellular polymeric substance

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure et anatomie de <i>Clarias gariepinus</i> ..	4
Figure 2. Image de <i>Clarias gariepinus</i> (mâle et femelle).	4
Figure 3. Étapes de formation d'un biofilm bactérien sur une surface immergée	11
Figure 4. Caractéristiques macroscopiques et microscopiques de <i>Streptomyces</i>	13
Figure 5. Cycle de développement de <i>Streptomyces</i> sur milieu	15
Figure 6. L'espèce <i>Clarias gariepinus</i> .	17
Figure 7. Caractérisation macroscopique.	24
Figure 8. Quantité de biofilms des deux isolats de <i>Vibrio spp</i> au cours du temps.	26
Figure 9. Activités antimicrobiennes ou non de quelques isolats de <i>Streptomyces spp</i> .	27
Figure 10. L'effet de l'extrait brut de ker-2 sur le biofilm formé par l'isolat I ₃ G	28

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Famille de poissons d'eau douce	2
Tableau 2. Classification systématique de <i>Clarias gariepinus</i>	3
Tableau 3. Causes des maladies de poissons en pisciculture	6
Tableau 4. Classification systematique de <i>Vibrio</i> spp.	7
Tableau 5. Classification systématique de <i>Streptomyces</i>	14
Tableau 6. Caractéristiques biochimiques.....	25
Tableau 7. Diamètres d'inhibitions des 06 isolats de <i>Streptomyces</i> bioactif vis-à-vis d'I ₃ G ..	27
Tableau 8. Inhibition de I ₃ G à différents ratios des extraits aqueux de Bel-12 et Ker-2	28

INTRODUCTION

Les poissons sont riches en éléments nutritifs et de ce fait, constituent une source de protéines majeures dans l'alimentation humaine. Selon les travaux de **Kenfack et al. (2019)**, le poisson représente environ 9.5% des besoins alimentaires de la population Camerounaise, où il est la principale source de protéines d'origine animale. Entre les années 2016 et 2020, on assiste à une multiplication des sites de piscicultures dans plusieurs quartiers des villes camerounaises de 1,1% et 7,6% (**MINEPIA, 2021**), conséquence de la pression faite par l'augmentation de la population et de la politique de l'import substitution prônée par l'État du Cameroun.

Toutefois, la production du poisson est sujette d'exposition à de nombreux contaminants, tels que les microorganismes pathogènes incluant les bactéries, les champignons, les parasites et les virus (**Moreira et al., 2021**). Ces microorganismes augmentent les risques de contaminations alimentaires liées à la consommation d'aliment à base de poisson. Cependant il existe une dizaine d'espèce pathogène de *Vibrio* qui sont à l'origine des maladies d'origine alimentaire dont les plus citées sont *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae*, qui appartient au groupe des bactéries, et sont souvent associées à plusieurs gastroentérites, d'infections cutanées et des septicémies chez l'homme (**Ignace et al., 2015**). Les espèces du genre *Vibrio* sont reconnues pour leur capacité à former des biofilms. Ces biofilms sont une communauté bactérienne très complexe et résistante qui contribue à leur persistance et virulence dans l'environnement.

Compte tenu des risques que peuvent représenter les biofilms en pisciculture, notamment dans la survenue des vibrioses chez le poisson, différentes méthodes de lutte contre ces formes de résistance sont souvent proposées. C'est le cas de : l'utilisation d'antibiotiques, extraits d'huile ou de désinfectants chimiques pour le traitement des surfaces (**Dillenseger, 2019**). Cependant, bien que parfois efficaces, l'utilisation abusive d'antibiotiques et d'extraits d'huile peuvent contribuer à la propagation des mécanismes de résistances des microbes, ceci par mutation ou par sélection (**Raissy et al., 2012**).

Par ailleurs, pour contourner toutes les méthodes précédentes du fait de leurs limites, les méthodes de bio-contrôles par utilisation des microorganismes à l'instar des bactéries du genre *Streptomyces spp* sont proposées. En effet, les actinobactéries du genre *Streptomyces* sont connus pour leur capacité à produire une diversité de métabolites secondaires bioactifs et représentent à cet effet une source prometteuse de composés antimicrobiens (**Bérdy, 2005**). Cette étude a donc pour objectif général d'évaluer l'activité antibactérienne et anti biofilm des extraits aqueux des *Streptomyces spp* vis-à-vis des *Vibrio spp*. isolés de *Clarias gariepinus*. Plus spécifiquement il s'agira de :

- 1) Évaluer la capacité de formation in-vitro des biofilms par les isolats de *Vibrio spp.*
- 2) Cribler les *Streptomyces spp.* capables d'inhiber *Vibrio*
- 3) Évaluer l'activité anti biofilm des extraits aqueux des isolats de *Streptomyces*

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

1.1. GÉNÉRALITÉ SUR LE POISSON D'EAU DOUCE

1.1.1 Description et classification des poissons d'eau douces.

Les poissons d'eau douce sont des espèces aquatiques qui vivent dans des eaux dont la salinité est très faible. On les retrouve dans presque tous les cours d'eau tels que les estuaires, les torrents, les grandes rivières, les lacs profonds, les fleuves et les ruisseaux. Il existe différentes espèces de poissons d'eau douce qui appartiennent à différentes familles comme démontré sur le tableau 1. On peut retrouver des espèces tels que ; *Clarias gariepinus*, *Salvelinus alpinus*, *Cyprinus carpio*, *Misgurnus fossilis*, *Silurus glanis*, *Tilapia zili*, *Gobio gobio* et bien d'autres (Jean *et al.*, 2013).

Tableau 1. Famille de poissons d'eau douce (Planquette, 1996)

Famille	Exemple d'espèces
La famille des <i>présidés</i>	Le silure, le brochet, le sandre, la perche, le black-bass
La famille des <i>salmonidés</i>	Les truites, saumons de fontaine, les truites de mer
La famille de <i>cyprinidés</i>	La carpe, la tanche, le barbeau, le chevesne, le gardon
Famille des <i>Acipenséridés</i>	Esturgeon de Sibérie
Famille des <i>Clupéidés</i>	Alose
Famille des <i>Esocidés</i>	Brochet
Famille des <i>Cobitidés</i>	Loche épineuses
Famille des <i>siluridés</i>	Silure glane
Famille des <i>Ictaluridés</i>	Poisson chat
Famille des <i>gasteroteidés</i>	Épinochette
Famille de <i>Cyprinodontidés</i>	Aphanius d'Espagne
Famille <i>Poecilidés</i>	Gambusie
Famille <i>Mugilidés</i>	Mulet doré
Famille des <i>Gadidés</i>	Lot de rivière
Famille des <i>Centrarchidés</i>	Perche soleil
Famille des <i>Percidés</i>	Sandre
Famille des <i>Cottidés</i>	Chabot
Familles des <i>Clariidae</i>	Poisson chat Africain

1.1.2 Mode d'alimentation des poissons d'eau douce

1.1.2.1 Aliments naturels et aliments supplémentaires

Les poissons d'eau douce en milieu naturel se nourrissent d'algues, de crustacés, d'insectes et de détritus. Leur comportement alimentaire varie en fonction de leur stade de croissance. Ils consomment environ 40% de poissons et d'insectes, d'autres consomment du phytoplancton, des mollusques, des arachnides et autres. (Blé *et al.*, 2008). L'étang est un habitat qui joue un rôle important dans la croissance du poisson car c'est une source naturelle de nutriment pour le poisson. Toute fois des déchets organiques locaux peuvent être utilisés comme aliments supplémentaires pour les poissons, notamment des aliments tels que le riz concassé, les miettes de pain, les céréales, les résidus de céréales, les farines de maïs, l'herbe de Guinée, les fruits, les légumes, les tourteaux d'arachides, le soja et les déchets brassicoles (Epiphane *et al.*, 2016).

1.1.3 Cas d'espèce de *Clarias gariepinus*

1.1.3.1 Classification

L'espèce *Clarias gariepinus* est classifié selon le tableau 2 ;

Tableau 2. Classification systématique de *Clarias gariepinus* (Poll et Gross, 1995)

Règne	Animal
Embranchement :	Cordé
Sous-embranchement.....	Vertébrés
Super-classe.....	Ostéichthyens
Espèce.....	<i>Clarias gariepinus</i>
Classe.....	Actinoptérygiens
Ordre.....	Siluriformes
Famille	Claridae
Genre.....	<i>Clarias</i>
Espèce	<i>Clarias gariepinus</i>

1.1.3.2 Morphologie de *Clarias gariepinus*

Clarias gariepinus est un poisson avec une coloration noire assez prononcée au brun clair (figure 1). Il a des taches aux nuances vert olive et grises à la partie inférieure de la tête et de l'abdomen blanc qui va jusqu'à l'extrémité des nageoires rougeoyants. Il a une grosse tête solide orientée vers le bas. La nageoire anale s'étend de la base de l'anus à celle de la nageoire caudale. *Clarias gariepinus* contient quatre paires de longs barbillons filamenteux. En outre

certaines de ces organes (organe labyrinthe) fonctionnent comme des poumons et permettent aux *claridés* la respiration aérienne dans des conditions pauvres en oxygène (Na-Nkorn et Brumet, 2009).



Figure 1. Structure et anatomie de *Clarias gariepinus*. (Na-Nkorn et Brumet, 2009).



Figure 2. Image de *Clarias gariepinus* (mâle et femelle) (Na-Nkorn et Brumet, 2009).

1.1.3.3 Alimentation de *Clarias gariepinus*

L'espèce *Clarias gariepinus* souvent qualifiée d'omnivore se nourrit des débris de végétaux, des insectes terrestres, des macros invertébrés, du plancton, des plantes, de fruits, et de crabes. Son régime alimentaire en milieu naturel est composé des aliments tels que des insectes, des micros invertébrés comme des larves d'insectes, les mollusques et les araignées. En milieu d'élevage son régime alimentaire est très différent. Il est composé de Nauplie d'Artémia, d'aliments artificiels comme des fermes fabriquées à base de sous-produits agricoles, ou d'aliments commerciaux. Ces aliments se présentent sous forme de farine, des miettes ou des granules dont la taille varie en fonction de la taille du poisson (Bwirabuciza, et al., 2024).

1.1.3.4 Intérêt économique et nutritionnel de *Clarias gariepinus*

On enregistre un record mondial de 214 millions de tonnes en 2020 sortant des productions halieutiques et aquacoles. Ce résultat est en grande partie grâce au développement de l'aquaculture en Asie. Selon les estimations, le secteur primaire aquacole emploie 58,5 millions

de personnes. Ceci dit, incluant les travailleurs et le secteur secondaire on estime environ 600 millions d'individus qui dépendent de la pêche et de l'aquaculture. Les produits halieutiques et aquacoles ont généré environ 151 milliards de dollars Américain en 2020 (FAO, 2022). Selon la FAO, en Afrique le poisson est un aliment très important car, il contribue à l'amélioration du statut nutritionnel de la population et à la sécurité alimentaire. Au Cameroun, le poisson est un aliment avec une valeur nutritionnelle intéressante car il est la source de protéine animale la plus consommée pour plus de 11 millions d'habitants. Il représente environ 44% de source de protéine et 7,6% des apports en protéines totales. Le poisson est riche en acides gras polyinsaturés, en micronutriments essentiels tels que le zinc, calcium, iode, protéine, fer, sélénium et vitamine (A et D et B). Il permet de garantir un équilibre nutritionnel à la population (Elvis *et al.*, 2021). On y retrouve également chez les poissons des omega-3 à longues chaînes nécessaires pour le bon développement du cerveau. Des experts s'accordent à dire que la consommation des poissons participe au développement optimal du système neuronal et du cerveau des enfants de ce fait, il est très important que les femmes enceintes en consomment (FAO, 2016).

1.1.4 Place de la pisciculture au Cameroun

Au Cameroun la production aquacole est à la fois une source de revenu pour le pays et source d'emploi. Elle contribue à 44% aux besoins nutritionnels de la population en protéines animales. On estime que les 2/3 de la population tirent leurs revenus des activités d'élevage et de la pêche. De plus, la production aquacole est passée de 4 400 tonnes par an en 2016 à 9100 tonnes en 2019. Des chiffres très intéressants qui peuvent croître au fil du temps (Nana et Tchoffo, 2024). Sur le plan économique la culture des poissons d'eau douce est une composante majeure de la pisciculture mondiale et revêt une importance économique croissante. En 2015 selon la FAO la production mondiale halieutique (poissons, crustacés, mollusques) était de 170 millions de tonnes pour l'aquaculture dont 70% en eau douce et 30% en eau de mer et saumâtre.

1.1.5 Problèmes liés à la survie du poisson en pisciculture

Il existe différents problèmes liés à la survie du poisson parmi lesquels les facteurs de stress qui affectent la survie des poissons. On peut y citer entre autres, une alimentation inadéquate, des substances toxiques, et des attaques d'organismes pathogènes (Rimstad *et al.*, 2011). Les différents microorganismes qui causent des maladies chez les poissons en pisciculture sont listés dans le tableau 3. Les bactéries qui causent les maladies aux poissons sont dues à la détérioration de la qualité de l'environnement, aux chocs et aux blessures qui surviennent lors des manipulations.

Tableau 3. Causes des maladies de poissons en pisciculture (Rimstad *et al.*, 2011).

Groupe de microorganisme	Microorganismes responsables
Virus	Virus des <i>salmonidés</i>
	Virus des <i>Cyprindés</i>
Bactéries	<i>Salmonicida</i> furunculose
	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	<i>Vibrio</i>
	<i>Mycobactérium</i>
	<i>Streptococcus</i>
Parasites	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>
	<i>Aphanomyces</i>
	<i>Saprolegenia</i>
	<i>Achlya</i>
	<i>Calyptrotheca</i>
	<i>Pythiopsis</i>
Champignons	<i>Thraustotheca</i>
	<i>Leptolegnia</i>
	<i>Leptomitius</i>

1.2. GÉNÉRALITÉS SUR LE PATHOGENE BACTERIEN DU POISSON D'EAU DOUCE

1.2.1 Description et classification

1.2.1.1 Description

Les espèces du genre *Vibrio* sont des bactéries ubiquitaires à gram négatif, ayant une forme en bâtonnet incurvés. Ces bactéries possèdent des flagelles polaires avec gaines. Elles sont très mobiles, non sporulant et anaérobies facultatifs. Ses tests biochimiques révèlent qu'ils sont positifs à l'oxydase et à la catalase. Les bactéries du genre *Vibrio* se caractérisent par leur caractère halophile, car elles peuvent supporter des teneurs en NaCl allant jusqu'à 10% mais restent très sensibles aux variations du pH. Cependant d'autres espèces de *Vibrio* peuvent se développer en absence de NaCl, à savoir ; *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* (Mohammadjavad, 2013).

Les *Vibrio* ont pour habitats de l'eau douce, des eaux côtières, des estuaires, des lacs, des rivières, des eaux de mer et des étangs. Ils poussent sur différents milieux tel que Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose (TCBS) avec des couleurs de colonies bleu-vert, et des colonies jaunes de 2-4mm. Sur Chrom-Agar les espèces de *Vibrio* se caractérisent par des colonies de couleur mauve, bleu-vert à bleu turquoise, tandis que sur gélose nutritive les colonies de *Vibrio* sont transparentes (**Angela et al., 2010**).

1.2.1.2 Classification

Les *Vibrio* sont des espèces issues de la famille vibrionaceae, avec pour ordre taxonomique *Vibrionales* et de genre *Vibrio*. Les espèces de *Vibrio* les plus courantes dans les infections des poissons sont *Vibrio.harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* (**Tilusha et al., 2023**). Le tableau 4 présente la classification de *Vibrio spp.*

Tableau 4. Classification systematique de *Vibrio spp.*

Règne.....	<i>Pseudomonadota</i>
Embranchement	<i>Protobacteria</i>
Classe.....	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre :.....	<i>Vibrionales</i>
Famille :	<i>Vibrionaceae</i>
Genre :	<i>Vibrio</i>

1.2.2 Causes et manifestations de la maladie bactérienne (vibrioses)

Vibrio spp. est un pathogène récurrent dans le secteur aquacole. Ces espèces sont des causes majeures de la maladie appelée la vibriose chez les poissons ou les alevins qui sont les plus exposés. (**Tilusha et al., 2023**).

En effet la maladie se développe dans le poisson grâce à l'interaction avec le pathogène. Ce dernier se retrouve dans l'eau via le canal de la dégradation environnementale. Comme cause on peut citer, les changements climatiques, l'eutrophisation en milieu naturel et la mauvaise pratique d'hygiène. La capacité pour un microorganisme de survivre dans un environnement sans dépendre de son hôte fait de celui-ci une espèce redoutable dans le secteur aquacole (**Ina et al., 2019**).

La température, la matière en suspension, le pH, le gaz toxique et les parasites externes sont des facteurs qui favorisent le processus pathologique. La charge excessive en nutriment dans les bassins est un autre facteur qui favorise la croissance microbienne et l'invasion des agents opportunistes.

En aquaculture les maladies se manifestent par des septicémies hémorragiques et des nécro-hémorragiques. Ainsi, la bactérie se multiplie d'abord dans les foyers infectieux locaux et externes. Ce qui est à l'origine d'hémorragies, d'ulcères cutanés, et de nécroses des nageoires. Elle peut aussi se développer dans des foyers d'infections internes, provoquant des anémies, exophthalmiques et des ascites. Lorsque les défenses naturelles du poisson sont affaiblies la bactérie colonise les tissus, ce qui conduit à la mort du poisson. Dans certains cas l'on assiste à des infections prolifératives externes. Ces dernières évoluent chroniquement et provoquent une hyperplasie des lamelles branchiales, ce qui affecte les fonctions respiratoires et conduit à la mort du poisson.

Les infections prolifératives profondes aussi rencontrées évoluent de façons lente et chronique provoquant des réactions hypertrophiques et hyperplasiques qui se manifestent par des granulomes des organes (**Jean et al., 2007**).

1.2.3 Risques associés à la présence de *Vibrio* en pisciculture

Les bactéries du genre *Vibrio* représentent une menace sérieuse pour la pisciculture car ces microorganismes peuvent causer des maladies graves chez les poissons d'élevages, entraînant ainsi des pertes économiques considérables pour les pisciculteurs (**Brian et al., 2016**). Certaines espèces de *Vibrio* tels que *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus* sont très pathogènes pour l'homme car elles peuvent causer des infections gastro-intestinales et des infections de la peau. En effet ces infections surviennent généralement après ingestions des fruits de mer contaminés cru ou mal cuits ou par un contact avec une plaie ouverte avec de l'eau contaminée. L'infection à *vulnificus*, peut être très grave chez les personnes immunodéprimées, avec des risques de septicémie (**Desmarchelier, 1997**).

1.3. GÉNÉRALITÉS SUR LES BIOFILMS

1.3.1 Définition

Un biofilm est une communauté microbienne sessile, qui existe sous forme de cellules attachées de manière irréversible à un substrat ou une interface. Il est conditionné dans une matrice de substances polymériques extracellulaires. Les substances polymériques extracellulaires (EPS) sont responsables de l'intégrité de la structure tridimensionnelle des

biofilms et de leur protection contre les conditions défavorables de l'environnement (**Kathirvel et al.,2020**).

1.3.2. Composition et écologie inter membranaire des biofilms

La matrice du biofilm est majoritairement composée de 97% d'eau. Elle est aussi constituée de polysaccharides, de lipides, acides nucléiques, d'agents tensioactifs, des glycolipides et de cations (**Flemming et al., 2010**).

La stabilité du biofilm dépend essentiellement de l'EPS, qui permet son adhésion à la surface. L'alginate, L'EPS, les protéines, et les lipides contenus dans la matrice sont des éléments essentiels dans la colonisation d'une surface. La matrice du biofilm est aussi composée de canaux de transport pour l'oxygène et les éléments nutritifs nécessaires aux bactéries du biofilm (**Flemming et al., 2010**).

1.3.3. Mécanisme de formation

La formation des biofilms, est répartie en quatre étapes (figure 7) : l'adhésion, la croissance, la maturation et la dispersion. La formation initiale passe par le conditionnement des films. C'est une étape importante pour l'adhésion microbienne sur les différentes surfaces. L'étape initiale permet de dégrader les substances physico-chimiques du substrat ce qui permet l'initiation du processus d'adhésion. La nature de la surface de formation du biofilm joue un rôle important dans le processus d'adhésion. Les surfaces rugueuses permettent une meilleure adhésion par rapport aux surfaces lisses. Les surfaces en plastiques montrent une forte capacité d'adhésion par rapport au métal ou aux objets en verres. La température du milieu et la concentration en nutriment favorisent la fixation du biofilm lorsque la vitesse du flux est élevée. Le flagelle des bactéries favorise l'attachement à la surface (**Tremblay et al., 2014**).

Adhésion à la surface

Des bactéries se fixent initialement à une surface impliquant des méthodes d'attachement passives tel que les forces de Van der Waals, la charge électrostatique, l'interaction hydrophobe et le mouvement Brownien. Cette fixation est faible et réversible. Si la bactérie n'est pas en capacité de se mouvoir alors, ce sont principalement les mécanismes intrinsèques à la paroi qui interviendront dans le mécanisme d'adhésion. Si la bactérie est mobile, alors les appendices interviendront également dans le processus. L'adhésion a lieu en deux phases, une adhésion réversible au début et une adhésion irréversible lors de la production de EPS (**Kathirvel et al.,2020**).



Croissance

Si les conditions sont favorables, les bactéries commencent à produire des structures bactériennes d'adhérence plus fortes comme les adhesines, pili et fimbriae. Durant cette période les bactéries sécrètent des composants de la matrice extracellulaire polymérique (EPS) qui permettra un encreage plus stable et une transition vers l'attachement irréversible à la surface.

Elle aboutit à la formation de nouvelles micro-colonies à couches multiples, qui vont s'associer au sein d'une matrice d'exopolysaccharide. La croissance du biofilm est initiée par le mécano transduction au sein des bactéries, mais aussi par un signal chimique contenue dans la matrice d'exopolysaccharide (**Jamal et al., 2018**).



Maturation

La maturation fait intervenir les canaux aux seins de la matrice d'EPS. Il se comporte comme un système circulatoire qui distribue l'oxygène, l'eau, les nutriments et évacue les déchets. Les molécules dites auto-induites sécrétées par les bactéries, circulent également et permettent la communication par *quorum sensing* (QS). À la fin de l'étape de maturation, le biofilm devient un milieu multi résistant. L'organisme dans ce milieu montre une sorte de résistance vis-à-vis de l'immunité de l'hôte aux traitements médicamenteux et à la dessiccation (**Tremblay et al., 2014**).



Dispersion

La dispersion est initiée par différents facteurs de stress mécaniques ou par un manque de ressources. Les facteurs tels que le cisaillement ou l'abrasion peuvent par un flux de liquide détacher des morceaux de biofilms contenant des bactéries. Lorsque le biofilm atteint une épaisseur, l'étape de dispersion est induite par un vieillissement du biofilm, par un stress ou une carence. Seules les cellules sous la forme planctonique sont libérées. Le changement phénotypique permettra le détachement des micro-organismes, ainsi vas favoriser la colonisation des nouvelles surfaces (**Clutterbuck, 2007**). La dispersion est divisée en deux actions ; une dispersion passive et une dispersion active.

La dispersion passive est liée à une force physique exercée au biofilm. Elle est composée de trois différents processus notamment ; le relargage, l'érosion et l'abrasion. Le relargage est une perte rapide et massive du biofilm, alors que l'érosion correspond au détachement continu des cellules individuelles ou aux plus petites parties du biofilm. Par contre l'abrasion est un détachement dû à la collision de particules fluide du biofilm.

La dispersion active est contrôlée par les mécanismes biologiques. Elle est provoquée par les enzymes qui permettent le détachement des micro-organismes. Ces enzymes dégradent la matrice cellulaire du biofilm. La dispersion du micro-organisme dans un milieu est accompagnée par une induction des gènes impliqués dans la mobilité des flagelles (**Sauer et al.,2002**).

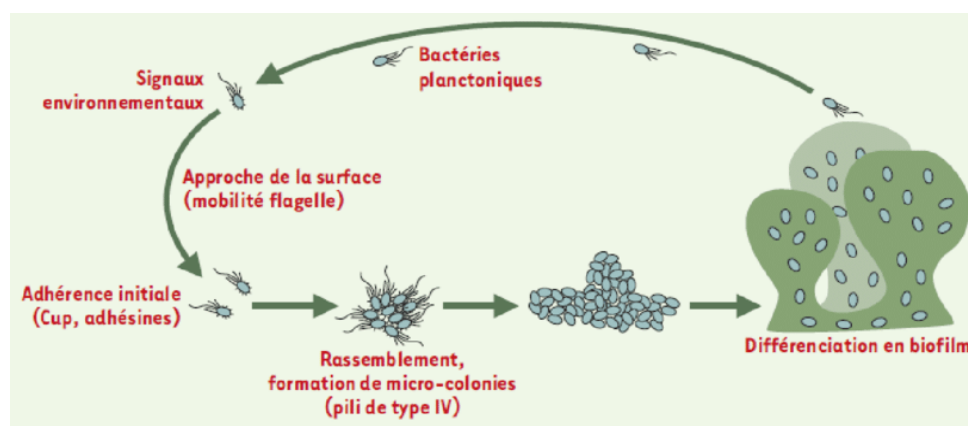


Figure 3. Étapes de formation d'un biofilm bactérien sur une surface immergée (**Filloux et Vallet, 2003**)

1.3.4. Propriétés de résistance des biofilms

L'une des caractéristiques principales des biofilms qui les différencie de leur équivalent planctonique, est leur capacité à survivre au sein d'environnements hostiles. Ces derniers deviennent ainsi une réelle préoccupation car ils sont responsables des infections en milieux hospitalier, dans le secteur alimentaire et présentent une capacité accrue à survivre à de fortes concentrations en antibiotiques (**Lebeaux et al., 2014**).

Plusieurs facteurs sont responsables de la résistance ou de la tolérance des biofilms face aux antimicrobiens. La matrice composée d'EPS agirait comme une barrière empêchant la diffusion des agents antimicrobiens. La plus grande résistance associée aux biofilms est dû au fait que les nutriments et l'oxygène ont du mal à traverser le biofilm, ce qui peut ralentir le métabolisme des bactéries et entraîner à un état de dormance de certaines bactéries. La disposition spatiale des microorganismes au sein d'un biofilm mature favorise probablement le transfert horizontal des gènes et ainsi l'augmentation de la résistance aux antibiotiques et d'autres facteurs de virulence (**Lewis, 2008**).

1.3.5. Conséquence de la présence des biofilms en pisciculture

Au sein des biofilms, les microorganismes développent des caractéristiques spécifiques tels que la modification phénotypique, la surproduction d'exopolymères, la favorisation des

communications chimiques intra-espèce et inter-espèce. Le biofilm est le mode de vie principal des bactéries aquatiques et terrestres. Il représente environ 90 à 99% de la biomasse bactérienne.

Les biofilms en milieu aquatique ont pour conséquence l'accumulation des éléments toxiques comme le mercure, le sélénium ou l'arsenic, ce qui crée des zones pauvres en oxygène dans les lacs, les rivières et les zones côtières, provoquant une eutrophisation des milieux (Géraldine *et al.*, 2010).

1.3.6. Gestion de la formation des biofilms en pisciculture

➤ Lutte physique

C'est une action mécanique dans le but de nettoyer les souillures des surfaces.

➤ Lutte chimique

Le traitement chimique utilisé ici, est pour l'élimination du biofilm en totalité à l'aide de diverses substances chimiques notamment, le vert de malachite, le permanganate, le potassium, la soude, l'alcool, qui sont utilisées pour lutter contre l'agent pathogène, ainsi que les organophosphorés, les organochlorés. Ceux-ci en effet, provoquent des dégâts au niveau des organes vitaux du poisson à cause de leur caractère toxique (Kone, 2015). Aussi les détergents enzymatiques comme les protéases, les lipases ou les amylases aident dans la dégradation de la matrice exopolysaccharide.

➤ Lutte biologique

Selon les chercheurs, les composés dérivés des extraits d'huiles, réduisent la croissance bactérienne et ainsi inhibent la formation des biofilms. Les études ont aussi montré que les polysaccharides et la nisine peuvent aussi inhiber la croissance des biofilms à travers la modification des propriétés physiques des deux surfaces abiotiques. En effet, l'utilisation de la nisine qui est une protéine extracellulaire produite par les souches de *Lactococcus lactis* favorise la formation des pores dans la membrane cellulaire des bactéries, ce qui conduit à la lyse cellulaire et la mort de ces bactéries (Dillenseger, 2019).

Le traitement grâce aux acides organiques permet de lutter contre la formation des biofilms. Par contre, l'effet antimicrobien des acides organiques est conditionné par de nombreux facteurs chimiques parmi lesquels on a la chaîne latérale des cellules, l'hydrophobicité ou la longueur de la chaîne.

1.4. GÉNÉRALITÉS SUR LES *STREPTOMYCES*

1.4.1. Description et classification

Les microorganismes du genre *Streptomyces* sont des espèces bactériennes aérobies, filamenteuses, à gram positif avec une croissance mycélienne et dont le matériel génétique contient plus de 70% de guanine-cytosine (Jhon, 2022).

Les colonies bactériennes du genre *Streptomyces* s'identifient par une morphologie opaque, rugueuse, et non étalée. Elles sont généralement incluses dans la gélose (figure 8). Les colonies de *Streptomyces* sont caractérisées par une croissance lente, et forment des mycéliums aériens et de substrats. Certaines souches produisent des pigments diffusibles et ont une température de croissance qui varie entre 25-35°C. Ils sont très répandus dans les écosystèmes terrestres et aquatiques. Dans le sol ces espèces représentent environ 1 à 20% du nombre total d'organismes viables.

Les *Streptomyces* jouent un rôle important dans les processus de biodégradation et bio remédiation car ils sont impliqués dans le renouvellement de la matière organique. Ces bactéries peuvent utiliser des matières organiques complexes grâce à la synthèse de diverses enzymes telles que les cellulases, les xylanases, les chitinases, et les pectinases. Le nombre de *Streptomyces* dans le sol est influencé par des conditions telles que le pH, la température, la quantité de matière organique, et l'aération (Sylvia, 2022).

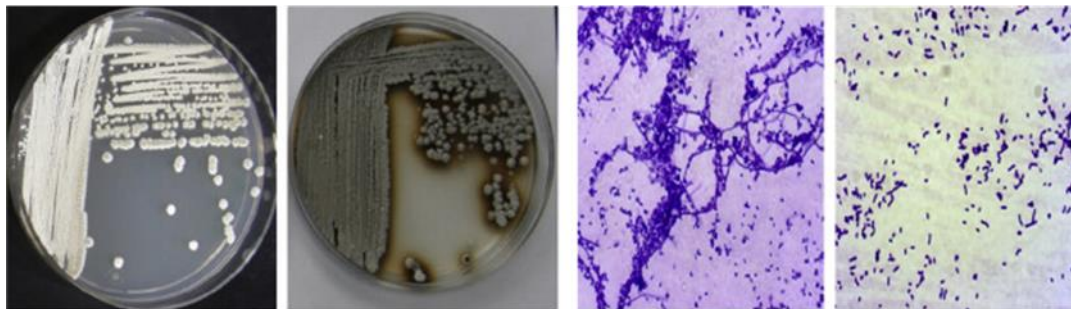


Figure 4. Caractéristiques macroscopiques et microscopiques de *Streptomyces* (Gopalakrishnan *et al.*, 2020)

Tableau 5. Classification systématique de *Streptomyces* (Ruan et Jisheng, 2013)

Règne :	<i>Bactérie</i>
Embranchement :	<i>Actinobacteria</i>
Classe :	<i>Actinomycetia</i>
Ordre :	<i>Actinomycètes</i>
Famille :	<i>Streptomycetaceae</i>
Genre :	<i>Streptomyces</i>
Espèces :	<i>Streptomyces spp.</i>

1.4.2. Intérêt de *Streptomyces*

Les *Streptomyces* sont reconnues pour produire des composés antimicrobiens, des enzymes, des sidérophores, et acides organiques. Ils sont impliqués dans la bio remédiation des milieux environnementaux contaminés, dans la fixation de l'azote atmosphérique et la solubilisation des phosphates. Certains produisent des métabolites secondaires pendant la phase stationnaire de croissance. Les *Streptomyces* possèdent la capacité de produire des antibiotiques à large spectre et des composés organiques volatiles. Ces différents composés agissent contre le pathogène en détruisant leurs cellules membranaires, ce qui entraîne la rupture de la communication entre les cellules pathogènes. Aussi, les *Streptomyces* contiennent une grande variété d'enzymes qui dégradent la paroi des microorganismes pathogènes. En aquaculture les souches de *Streptomyces* ont la capacité de produire des composés antagonistes pour créer une zone de compétition pour les nutriments et ainsi crée un espace pour l'inhibition du pathogène (Sandra, et al., 2021)

1.4.3. Caractères morphologiques

Les *Streptomyces* produisent des mycéliums aériens et végétatifs, ont une paroi et forment des chaînes de spores non mobiles dans un fin fourreau fibreux (figure 9). Ainsi les hyphes et les filaments se différencient pour former des chaînes de conidiospores asexuées. Les conidies de chaque chaîne sont pigmentées et peuvent être lisses, velues ou épineuses. On identifie les *Streptomyces* par leurs caractères morphologiques incluant l'utilisation des glucides, leur synthèse de la mélanine, la réduction du nitrate, l'hydrolyse de l'urée et l'acide hippurique (Jodi et al.,2019).

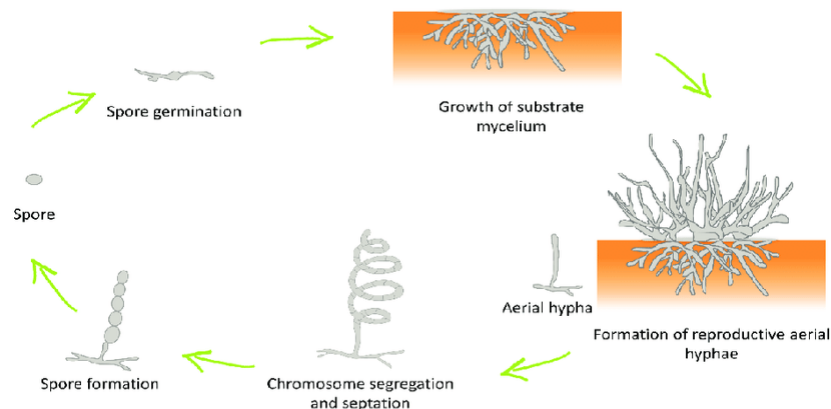


Figure 5. Cycle de développement de *Streptomyces* sur milieu (Jodi *et al.*,2019)

1.4.4. Caractères cultureux

Les *Streptomyces* sont des mésophiles de base mais certaines souches peuvent être des psychrophiles ou thermophiles. Ils se développent dans les milieux supplémentés par une variété de source de carbone organique avec des températures optimales de croissance qui varient entre 25°C et 35° C et des pH compris entre 6,5 et 8,0. Leurs croissances nécessitent une source d'azote inorganique car la présence de celui-ci en quantité élevée dans le milieu permet au mycélium aérien de se différencier pour produire des conidiospores. Lorsque la culture de *Streptomyces* est faite à partir d'un ensemencement des conidiospores, la croissance débute par la production d'un mycélium végétatif suivi par la formation d'un mycélium aérien. Ce qui conduit à la production des conidiospores dont les conidies prennent des pigments bleu, gris vert, rouge, violet ou jaune en fonction de la composition du milieu (Messaoudi, 2020).

En milieu solide la culture des *Streptomyces* débute par la production d'un tube germinatif qui va se développer pour former des hyphes. Ces derniers seront ensuite ramifiés, et le mycélium primaire se développe à l'intérieur comme à la surface du substrat. Ainsi le mycélium secondaire va se développer à la surface des colonies (Saffroy, 2006).

En milieu liquide, l'aération du milieu est très importante pour permettre une bonne circulation d'oxygène ou une agitation constante pour fournir au microorganisme de l'oxygène. Ceci permet une augmentation de la croissance et une accumulation de biomasse, ce qui a un impact majeur dans la production des métabolites secondaires. Dans ce type de milieu, seul le mycélium primaire se développe et les *Streptomyces* se présentent sous forme de filaments libres, de groupe de mycélium ou sous forme de pellet (Cerri et Badino, 2012).

1.4.5. Production des antimicrobien par les *Streptomyces*

Les *Streptomyces* ont la capacité de produire une variété de molécules bioactifs comme des antibiotiques à 50%, les antifongiques, les immunosuppresseurs, les molécules anti tumorales, les antiparasitaires, les antioxydants. En 2020 les études ont permis de découvrir plus de 70 nouveaux métabolites secondaires provenant des espèces de *Streptomyces*. Cette gamme de métabolites variés comprend des peptides cycliques et linéaires, des dérivés de peptides, des polypeptides, des terpénoides, des poly-aromatiques, des macrocycles et des furannes (**Heather et Peter, 2022**). Ces microorganismes ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de leurs activités biologiques grâce à leur capacité de produire de nouveaux composés chimiques et leurs grandes valeurs commerciales. En effet de nombreuses espèces de *Streptomyces* ont été évaluées avec succès en tant qu'agents de biocontrôle contre les phytopathogènes (**Shakeel et al., 2018**).

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL

2.4.1. Matériel biologique

Le matériel biologique était constitué :

- Des isolats de *Streptomyces* utilisés comme antagonistes contre *Vibrio*. Ces isolats ont été fournis par le laboratoire de Microbiologie de l'université de Yaoundé I,
- De l'espèce *Clarias gariepinus* pour l'isolement du pathogène (*Vibrio spp.*)



Figure 6. L'espèce *Clarias gariepinus*.

2.4.2. Matériel du laboratoire

Le matériel de laboratoire comprenait des milieux de cultures, des réactifs et des appareils ;

2.4.3. Milieux de culture

Divers milieux de cultures ont été utilisés. Les plus importants étaient :

- Le Kuster amidon principalement utilisé pour la culture de l'isolat de *Streptomyces spp.*
- Le TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose) qui est un milieu de culture sélectif utilisé pour l'isolement des bactéries du genre *Vibrio spp.*
- Le milieu Mueller Hinton pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne de *Streptomyces* vis-à-vis des isolats de *Vibrio spp.*
- Le bouillon nutritif utilisé pour le repiquage des bactéries du genre *Vibrio spp.*

2.4.4. Réactifs

- L'eau étant un solvant a été utilisé pour l'extraction des métabolites secondaires des isolats de *Streptomyces spp.*

2.4.5. Appareils

Les appareils utilisés comprenaient :

- Le spectrophotomètre de la marque Jenway 7305 qui a été utilisé pour la lecture des densités optiques,
- L'étuve pour fixer les biofilms sur les parois du tube Falcon,
- L'autoclave de la marque SAVATEC a été utilisé pour la stérilisation des milieux de culture,
- Les micros filtrent de 0,22µm et le papier Wattman de porosité 10µm ont été utilisés pour la filtration d'extraits liquides,
- BLENDER de la marque SILVER CREST a été utilisé pour le broyage des branchies et des viscères,

2.2 MÉTHODES

Ce travail a été effectué en trois principales phases conformément aux objectifs spécifiques initialement définis ; à savoir : l'évaluation de la capacité de formation in-vitro des biofilms par les différents isolats de *Vibrio*, le criblage de *Streptomyces* capables d'inhiber *Vibrio spp.* et l'évaluation de l'activité anti biofilm des extraits aqueux des isolats de *Streptomyces spp.*

2.2.1 Évaluation de la capacité de formation des biofilms par les isolats de *Vibrio spp.*

2.2.1.1 Échantillonnage de l'espèce *Clarias gariepinus* et isolement de *Vibrio spp.*

L'échantillonnage a été réalisé à Damas dans le 3^{ème} arrondissement de Yaoundé 3°51'8''N 11°29'48E. L'échantillon de *Clarias gariepinus* a été prélevé à l'aide d'un filet à pêche et de l'eau à l'aide d'un gobelet et l'ensemble a été introduit dans un seau nettoyé avec de l'eau bouillante et transporté au laboratoire de Microbiologie pour l'isolement des *Vibrio spp.*

L'isolement du genre *Vibrio spp.* a été fait en prélevant les branchies et les viscères du poisson puis à l'aide d'une balance, 10G de chacune des parties ont été pesées, puis broyées à l'aide d'un mixeur de la marque SILVER CREST préalablement désinfecté à l'alcool 70° (v/v). Les différents broyats ont ensuite été introduits dans deux erlenmeyers contenant chacun 90 ml d'une solution stérile d'eau peptonée salée à 2% NaCl, puis incubés à 37°C pendant 24 h. Au bout de cette période une série de dilution décimale a été réalisée allant de 10⁻² à 10⁻⁶. Cent microlitres (0,1ml) de chaque dilution a étéensemencée en surface dans des boîtes de Pétries contenant la gélose TCBS, puis incubé pendant 24 h à 37°C. Les colonies caractéristiques de

Vibrio ont été identifiées sur la base de la couleur et la forme des colonies. Ainsi les colonies vertes, jaunes, rondes avec des bordures régulières et translucides ont été retenus (**Odeomelam et al., 2023**). Les isolats retenus ont été purifiés en les repiquant successivement trois fois par la méthode de stries sur TCBS jusqu'à obtention des colonies pures. Ces dernières ont été soumises à différents tests biochimiques pour confirmation, puis conservées dans du glycérol à -20°C jusqu'à utilisation.

2.2.1.2 Caractérisation microscopique et biochimique des espèces du genre *Vibrio*

Un examen microscopique et des tests biochimiques ont été effectués.

➤ Examens microscopiques

Il comprenait deux tests parmi lesquels :

- **L'état frais** : L'observation à l'état frais a permis de mettre en évidence la mobilité des isolats. À cet effet une colonie bactérienne a été introduite dans 9 ml d'eau distillée ensuite une goutte de la suspension bactérienne obtenue a été déposée sur une lame porte objet puis l'ensemble a été recouvert d'une lamelle et l'observation s'est faite au microscope à l'objectif x40.
- **L'état coloré** : La coloration de gram a permis de déterminer le type de gram des différentes colonies. À cet effet, elle a été réalisée selon les étapes suivantes :
 - Une coloration de la paroi bactérienne au violet de gentiane ou au cristal violet a été réalisée pendant 1min ;
 - Ensuite, l'ajout du lugol pour renforcer la coloration du cristal violet pendant 1min ;
 - Une décoloration a été faite grâce à l'alcool à 95°C durant 10 à 30s ;
 - Enfin une contre coloration à l'aide de la fuschine a permis de colorer les bactéries en rose ;

➤ Caractérisation biochimique

Elle a consisté à mettre en évidence les capacités des isolats à tolérer de fortes concentrations de NaCl et à posséder plusieurs enzymes telles que : l'oxydase, la catalase, et la bêta-galactosidase ainsi qu'à dégrader plusieurs sucres à l'aide de la galerie api 20E, et la formation des biofilms.

- **Test à la catalase**

Ce test a été réalisé en déposant sur une lame stérile une colonie jeune de 18-24h avec ajout d'une goutte d'eau oxygénée. Après mélange, l'ensemble a été incubé pendant 2 minutes le temps au bout duquel l'apparition des bulles traduit un résultat positif (que le microorganisme possède la catalase) (**Halima et al., 2022**).

- **Teste à l'oxydase**

Il a été réalisé en déposant un disque d'oxydase non imprégné sur une lame stérile, ensuite une colonie bactérienne de 24h a été déposée sur le disque et l'ensemble a été incubé pendant 2 minutes. L'activité oxydase a été appréciée en notant l'apparition d'une coloration violette (**Shields et al., 2010**).

- **Test de dégradation des sucres**

Il consistait à identifier les différentes espèces de bactéries en analysant leur capacité à dégrader différents sucres. Une suspension bactérienne de 18-24h a été introduite dans des tubes. Chaque tube contenant un sucre spécifique (glucose, lactose, sucrose, mannose et autres) et un indicateur de pH. La bactérie possédant des enzymes nécessaires pour fermenter le sucre présent dans le tube, métabolise en produisant des acides organiques, le virage de l'indicateur entraîne un changement de couleur ce qui indique en conséquence, une réaction positive (**Devenish et al., 2014**).

- **Test de tolérance au NaCl**

100µl de suspension bactérienne liquide ont été introduits dans un bouillon nutritif supplémenté en NaCl à des pourcentages allant de 1% à 7%. L'incubation s'est faite à une température de 37°C pour la croissance de la bactérie. La tolérance au NaCl a été appréciée par observation de la turbidité des tubes. (**Shuyang et al., 2022**).

2.2.1.3 Formation des biofilms par les différents isolats de *Vibrio*

L'étude de la formation des biofilms s'est faite pendant 168 heures pendant lesquelles, les isolats présomptifs de *Vibrio* obtenus ont été repiqués dans 100ml de bouillon nutritif ensuite incubés à 37°C pendant 24h. 5ml de ce bouillon ont été introduits dans sept (7) tubes Falcons stériles à l'aide d'une micropipette, puis incubés à 37°C. Ces essais ont été réalisés en double. Le suivi de la formation des biofilms s'est fait après chaque 24heures pendant 168heures. Tous les 24heures, le contenu de deux tubes Falcons a été verser et ensuite rincer trois fois de suite avec de l'eau distillée stérile afin de retirer les microorganismes planctoniques. Les tubes ont ensuite été séchés à l'étuve à 60°C pendant 45min. Un volume de 5ml de solution de Crystal

violet a été ajouté dans les tubes et l'ensemble a été laissé au repos pendant 15mins puis, les tubes ont été rincés trois fois avec de l'eau distillée. Ces tubes ont été décolorés avec de l'alcool à 95°C (Stepanovic *et al.*, 2000) et la densité optique a été lue à une longueur d'onde de 570nm. La quantité de biofilms formée étant proportionnelle à l'absorbance.

2.2.2 Criblage de *Streptomyces* spp. capables d'inhiber *Vibrio*.

Les isolats de *Streptomyces* utilisés dans ce travail ont été choisis à partir de la banque de souches du laboratoire de Microbiologie comme ceux ayant montré une activité antimicrobienne vis à vis des bactéries gram négatif dans les travaux précédents (Godwe, 2023; Zé, 2024 ;). Il s'agissait des 12 isolats consignés dans le tableau 1.

Tableau 1. Code des isolats de *Streptomyces* spp. et caractères macroscopiques.

Isolats	Couleur du mycélium	Couleur du pigment	Gram	Forme
Bel-12	Rose-orangé	Orange	+	Filamenteuse
Ker-1	Marron	Aucune	+	Filamenteuse
Ker-2	Gris opaque	Or- sombre	+	Filamenteuse
Bel-13	Gris	Aucune	+	Filamenteuse
Bel-43	Blanc	Aucune	+	Filamenteuse
Lot1-7	Marron	Aucune	+	Filamenteuse
Lot1-6	Rose-orangé	Marron	+	Filamenteuse
Bel-5	Blanc	Aucune	+	Filamenteuse
Bel-31	Marron	Orange	+	Filamenteuse
Bel-14	Marron	Blanc	+	Filamenteuse
B*	Blanc	Jaune	+	Filamenteuse
Bel-16	Blanc	Jaune	+	Filamenteuse

2.2.2.1 Revivification et purification des isolats de *Streptomyces*.

La revivification des isolats de *Streptomyces* a consisté à prélever 100µl de suspension de spores contenu dans des tubes Eppendorf à l'aide d'une micropipette, et à les introduire dans 9ml de bouillon nutritif stérile et incubé à 37°C pendant 24h. Les cultures obtenues ont été ensuiteensemencées par stries sur gélose Kuster-amidon toutes les 120 heures jusqu'à obtention

des colonies pures. Après purification les isolats ont été cultivés par stries resserrées sur gélose Kuster- amidon pendant 7jrs à température ambiante ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$) pour utilisation ultérieure.

2.2.2.2 Évaluation de l'activité antagoniste des isolats de *Streptomyces* vis-à-vis de *Vibrio*

L'évaluation de l'activité antibactérienne des isolats de *Streptomyces* vis-à-vis de *Vibrio* s'est faite par la technique des cylindres d'agar décrite par **Balouiri et al., (2015)**. À cet effet, des cylindres d'agar de 7mm de diamètre ont été découpés à partir de la gélose issue d'une culture de *Streptomyces* âgée de 7jrs grâce à un emporte-pièce stérile ; ensuite déposés sur une gélose Mueller Hinton précédemment ensemencé par écouvillonnage d'une suspension de chaque isolat de *Vibrio* à la concentration de 10^6 UFC/ml. L'ensemble a été incubé à 4°C pendant 1heur pour la diffusion des composés bioactifs ensuite incubé pendant 24heurs à 37°C . Puis les diamètres des auréoles d'inhibitions ont été mesurés grâce à un pied à coulisse. Les différents diamètres d'inhibitions obtenus de chaque isolat de *Streptomyces* ont été comparés et les isolats présentant les meilleurs diamètres ont été conservés.

2.2.3 Évaluation de l'activité anti biofilm des extraits aqueux des isolats de *Streptomyces*.

2.2.3.1 Production des extraits aqueux des isolats de *Streptomyces*

La production des extraits aqueux des isolats de *Streptomyces* les plus actifs s'est faite par inoculation des colonies âgées de 7jrs de ces isolats dans 800 ml de bouillon nutritif stérile, puis l'ensemble incubé sous agitations manuelles et à des intervalles de temps réguliers pendant 10 jours à température ambiante. Après incubation la préparation a subi une première filtration sur papier Wattman numéro 1, puis une seconde filtration grâce à des micros filtres de porosité $0,22\mu\text{m}$. Les filtrats issus de cette seconde étape constituaient les extraits aqueux (**Larasati et al., 2021**).

2.2.3.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice.

Dans l'objectif de déterminer la plus petite concentration de l'extrait aqueux capable d'inhiber la croissance des isolats de *Vibrio* et donc la formation du biofilm, un test d'inhibition a été réalisé *in-vitro*. Pour cela des volumes de 0,15ml, 0,25ml, 0,5ml, 1ml, 2ml d'extraits ont été mélangés avec la gélose Mueller Hinton en surfusion préalablement ensemencée d'un inoculum de *Vibrio* à une concentration de 1.5×10^4 cellules/ml (**Jepri et al., 2022**). Le mélange extrait + gélose pour un volume total de 20ml, a permis d'obtenir les concentrations volumiques d'extraits de : 0,1 ; 0,05 ; 0,025 ; 0,0125 et 0,0075 (ml d'extrait/ml de milieu). Après la prise en masse de la gélose les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h. La boîte contenant le plus petit volume d'extrait pour lequel aucune croissance visible de *Vibrio* n'a été observée, constitue la concentration volumique minimale inhibitrice (**Abhishek et Tanu, 2022**).

2.2.3.3 Évaluation de l'activité anti biofilm

L'activité anti biofilm des extraits aqueux s'est faite en utilisant les extraits aux concentrations simple (CS) et double (CD) de la CMI selon le protocole décrit par **Jaspal et al., (2020)**. Pour ce faire une suspension (concentration 10^8 UFC/ml) de l'isolat de *Vibrio* a été repiquée dans 100ml de bouillon nutritif ensuite incubée pendant 24h à 37°C. Un volume de 5ml de l'isolat de *Vibrio* incubé à 37°C a été introduit dans 4 tubes Falcons stériles avec répétitions. Ensuite un volume d'extrait aqueux correspondant aux CS et CD a été ajouté de manière simultanée dans les tubes. En parallèle un tube témoin (contenant uniquement le *Vibrio* sans extrait) et l'ensemble ont été incubés au temps où la formation du biofilm était élevée et à 37°C. Au bout de ce temps l'évaluation du biofilm formé a été réalisée par lecture de l'absorbance à 570nm comme décrit au paragraphe 8 de la méthodologie.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 RÉSULTATS

3.4.1. Caractéristiques des isolats de *Vibrio* spp. isolés de *Clarias gariepinus*

3.4.1.1. Caractéristiques macroscopiques

L'isolement des *Vibrio* à partir de l'échantillon de l'espèce *Clarias gariepinus* a permis d'obtenir deux isolats présumés du *Vibrio* tous différents par leurs caractéristiques macroscopiques.

De ces caractéristiques il en ressort que les colonies de l'isolat I₁V présentent une couleur verte translucide, de forme circulaire à contours réguliers avec halo clair, et une surface luisante et une taille de 2 à 3 mm.

L'isolat I₃G forme des larges colonies plates de couleur jaune, aspect pâteux à bordure régulier avec une taille de 2 à 3 mm.



Figure 7. Caractérisation macroscopique.

3.4.1.2. Caractéristiques microscopiques

L'étude de l'observation microscopique a permis de révéler :

- **La forme des cellules** : Bâtonnet incurvé
- **Regroupement et mobilité** : très mobile et isolés

3.4.1.3. Caractéristiques biochimiques

L'étude des caractères biochimiques à travers la dégradation de divers substrats carbonés présenter sur le tableau 6 a permis de montrer que, l'isolat I₃G dégrade le Glucose, l'Amygdaline, le Mannitol et le Saccharose excepté le Sorbitol, l'Inositol, le Rhamnose, l'Arabinose et la Melibiose. Quant à l'isolat I₁V il dégrade le Glucose, l'Amygdaline, Mannitol et est négatif pour le reste des glucides.

Les deux isolats présumptifs de *Vibrio* ont la capacité de synthétiser tous les enzymes excepté le Tryptophane désaminase, l'Uréase, l'Indole et l'Arginine déshydrogénase. Ils sont négatifs au Pyruvate de sodium, au Thiosulfate, et sont positifs au Trisodium citrate. Ces isolats présumptifs de *Vibrio* peuvent tolérer une teneur en NaCl allant jusqu'à 6%. Après analyse, les résultats ont été traités avec le logiciel d'identification UPBM. L'isolat I₃G a été identifié comme étant *Vibrio cholerae* (49,1%) et l'isolat I₁V comme *Vibrio vulnificus* (89,6%).

Tableau 6. Caractéristiques biochimiques

Substrat		I ₃ G	I ₁ V
Dégradation des glucides	Glucose	+	+
	Amygdaline	+	+
	Mannitol	+	+
	Arabinose	-	-
	Saccharose	+	-
	Inositol	-	-
	Sorbitol	-	-
	Rhamnose	-	-
	Melibiose	-	-
Recherche des enzymes	Arginine déshydrogénase	-	-
	Lysine décarboxylase	+	+
	Tryptophane désaminase	-	-
	Uréase	-	-
	Ornithine décarboxylase	+	+
	Lactose	+	+
	Gélatinase	+	+
	Catalase	+	+
	Oxydase	+	+
Autres	Indole	-	-
	Pyruvate Sodium	-	-
	Thiosulfate de sodium	-	-
	Trisodium citrate	+	+
	Tolérance au NaCl	++	++

+= Dégradation des sucres ou des enzymes, - = Pas de dégradation, ++ = Tolérance au NaCl jusqu'à 6%.

3.1.1.4 Formation de biofilms de *Vibrio* spp.

La capacité des isolats présomptifs de *Vibrio* spp. à former les biofilms, a été évaluée. Les quantités de biofilms formées (proportionnelle à l'absorbance à 570 nm) par chaque isolat et évaluées toutes les 24 h pendant 168 h sont représentées par la figure 8. Il ressort de cette figure que la quantité de biofilms formée par les isolats augmente aux premières heures pour atteindre un pic à la 120^{ème} h aussi bien pour I₃G que pour I₁V. Au-delà de ce temps on assiste à une diminution de la quantité du biofilm formée. Par ailleurs, la formation du biofilm étant plus importante chez I₃G que celle d'I₁V. L'isolat I₃G a été retenu pour la suite du travail.

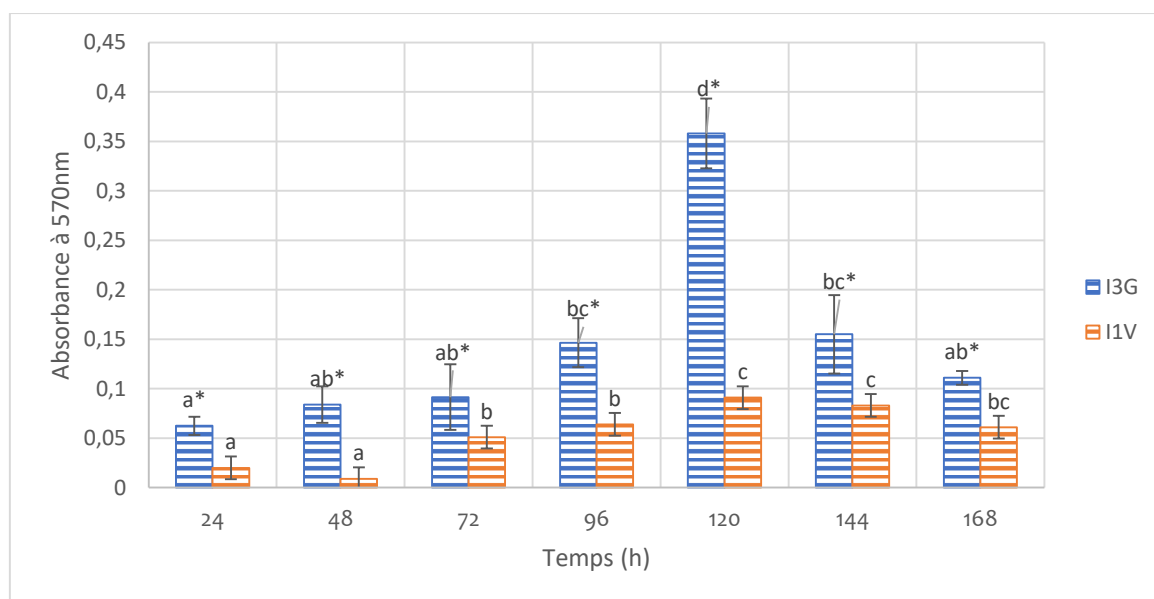


Figure 8. Quantité de biofilms des deux isolats de *Vibrio* spp au cours du temps.

Les absorbances du même isolat suivit de différentes lettres sont statistiquement différentes au seuil de significativité de 95%. *= différence significative ($P < 0.05$) entre les isolats de *Vibrio*.

3.4.2. Activité antibactérienne de quelques isolats de *Streptomyces* spp. vis-à-vis de l'isolat I₃G

L'activité antimicrobienne des isolats de *Streptomyces* a été évaluée en présence d'I₃G afin de retenir ceux capables d'inhiber la croissance de l'agent pathogène. Les diamètres d'inhibitions obtenus de cette évaluation sont consignés dans le Tableau 7 et illustrés par la figure 10. Il en ressort que, six (06) sur les douze (12) isolats de *Streptomyces*, à savoir : Bel-12 ; Ker-2 ; Ker-1 ; Lot1-7 ; Lot1-6 et B*, ont présenté une activité antimicrobienne vis-à-vis de I₃G ; avec des diamètres d'inhibitions compris entre $7,5 \pm 0,7$ mm et $24,5 \pm 1,4$ mm. Les deux isolats ayant présenté les meilleurs halos d'inhibition à savoir : Bel-12 et Ker-2 ont été retenus pour les tests anti biofilms.

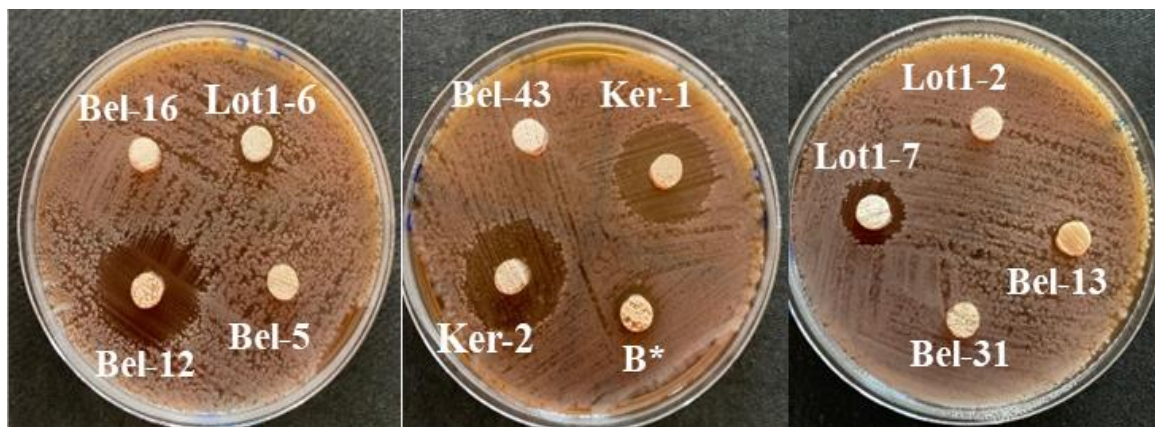


Figure 9. Activités antimicrobiennes ou non de quelques isolats de *Streptomyces* spp.

Tableau 7. Diamètres d'inhibitions des 06 isolats de *Streptomyces* bioactif vis-à-vis d'I₃G

Code des isolats	Diamètre d'inhibitions (en mm)
Bel-12	24,0±1,4 ^d
Ker-2	23,5±2,1 ^{cd}
Ker-1	20,5±0,7 ^c
Lot1-7	11,0±1,4 ^b
Lot1-6	7,5±0,7 ^a
B*	8,0±0,0 ^a
Bel-16	0,0±0,0
Bel-5	0,0±0,0
Bel-13	0,0±0,0
Lot1-2	0,0±0,0
Bel-31	0,0±0,0
Bel-43	0,0±0,0

Les résultats sont présentés Moyenne ± Ecart-type. Les moyenne des diamètre d'inhibition suivies de différentes lettres sont statistiquement différentes au seuil de (P<0.05).

3.1.3 Activité bactéricide de l'extrait aqueux sur milieu solide vis-à-vis de l'isolat I₃G (détermination des CMI).

L'incorporation des extraits aqueux à différents volumes d'extraits des différents isolats de *Streptomyces* dans la gélose Mueller-Hinton contenant I₃G à la concentration de 1,5x10⁴ cellules/ml, a permis d'obtenir les résultats d'inhibitions ou non de la croissance de I₃G consignés dans le tableau 8. Il en ressort qu'aucune des concentrations de l'isolat Bel-12 évaluées n'a permis d'empêcher la croissance de I₃G. L'extrait de Ker-2, aux concentrations de

0,05 (ml/ml) et 0,1 (ml/ml) inhibent la croissance de I₃G, faisant ainsi de la concentration 0,05 ml d'extrait /ml de milieu, la plus petite concentration d'extrait de Ker-2 empêchant la croissance visible de l'isolat présumé de *Vibrio*.

Tableau 8. Inhibition de l'isolat de I₃G à différents ratios des extraits aqueux de Bel-12 et Ker-2

Isolats	Concentrations volumiques (v/v) d'extraits aqueux dans le milieu				
	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.00625
Ker-2	+	+	-	-	-
Bel-12	-	-	-	-	-

+ = Inhibition - = pas d'inhibition

3.1.3.1 Activité des extraits aqueux de *Streptomyces* vis-à-vis des biofilms de l'isolat I₃G.

Les résultats de l'évaluation de l'activité anti biofilms des extraits liquides ont permis d'apprécier la capacité d'inhibition de l'extrait Ker-2 à différents volumes. On observe une diminution de la formation des biofilms lorsque l'isolat présumé de *Vibrio* est cultivé en présence des extraits de *Streptomyces*. Ces résultats ont été collectés après 120h.

La double concentration (CD) en extrait montre une inhibition de 48,7% par rapport à la simple concentration qui montre une inhibition de 39,8%.

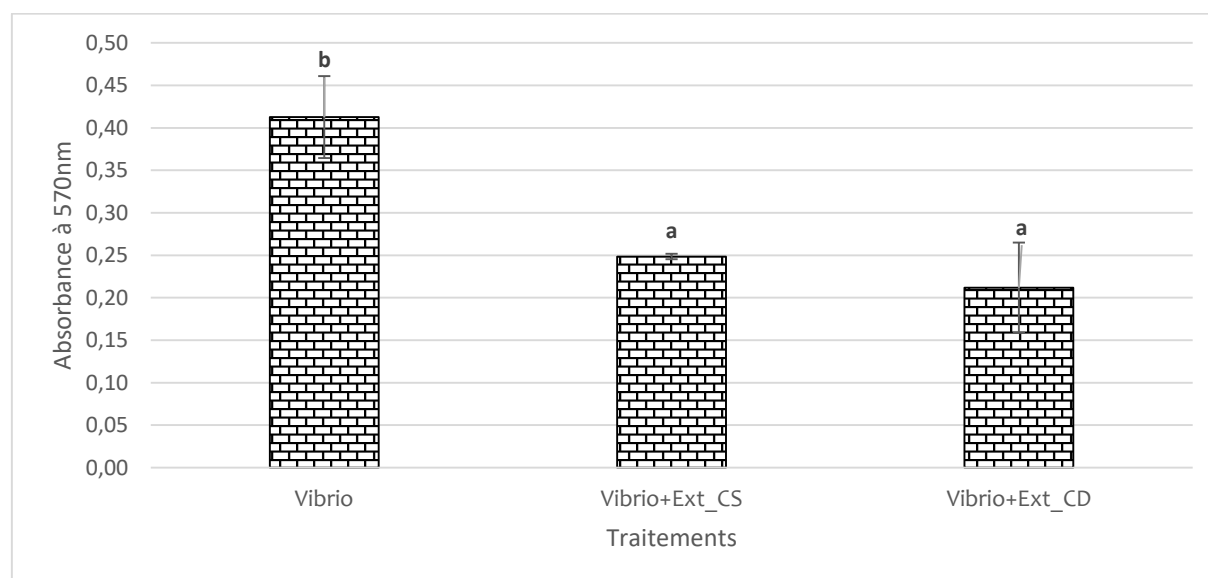


Figure 10. L'effet de l'extrait brut de ker-2 sur le biofilm formé par l'isolat I₃G

Ext= extrait, CS= Concentration d'extrait aqueux simple, CD= Concentration double d'extrait aqueux. L'absorbance des deux concentrations d'extraits suivies des lettres similaires n'est pas statistiquement significatif.

3.2 DISCUSSION

L'aquaculture, est un secteur de production alimentaire en croissance rapide qui fait souvent face à des potentiels dangers tels que les contaminations bactériennes à l'instar de *Vibrio*. Ceux-ci sont reconnus pour leur capacité à produire des biofilms qui sont des formes de résistances microbiennes. Alors que les méthodes de lutte actuelles perdent progressivement leur efficacité, un besoin urgent émerge pour développer des méthodes antimicrobiennes alternatives. C'est ainsi que cette étude, qui avait pour but de proposer une solution permettant de réduire la formation des biofilms de *Vibrio* dans l'environnement aquacole, a permis d'isoler à partir de l'espèce *Clarias gariepinus* deux différentes espèces présomptives de *Vibrio*. Ces derniers s'apparentant à *Vibrio cholerae* (I₃G) et *Vibrio vulnificus* (I₁V). La présence de ces germes dans le poisson peut s'expliquer par une combinaison de facteurs environnementaux naturels (présence naturelle de *Vibrio* dans la microflore des poissons), de mauvaises pratiques d'élevage (l'accumulation des nutriments, la température, l'oxygène dissous), ou de potentielles intrusions externes (l'approvisionnement en eau pour renouveler les bassins d'élevage, le matériel et l'équipement) (Ina *et al.*, 2019). En effet, le genre *Vibrio* étant une bactérie thermophile tolérable prolifère grâce à des températures élevées de l'eau. Par ailleurs, ce résultat est en accord avec ceux de Aubin *et al.*, (2024) qui ont relevé la présence de plusieurs espèces de *Vibrio* à savoir *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginotycus*, *Vibrio vulnificus* et autres qui ont été isolées du poisson et de l'eau dans les structures d'élevage qui est reliée aux activités aquacoles telles que, l'alimentation des poissons et la concentration des déchets métaboliques des poissons.

Après avoir obtenu ces deux espèces présomptives *Vibrio*, il était question d'évaluer leur capacité à former des biofilms sur un matériau en polypropylène. Le résultat obtenu a montré une différence de la quantité du biofilm formée par les deux isolats de *Vibrio*. Ce résultat corrobore avec ceux de Leighton *et al.*, (2023) qui ont montré que la température, le pH et le type de matériaux influencent la biomasse du biofilm formée par *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus* isolés du sang humain et du système digestif. Cette différence pourrait s'expliquer par des mécanismes qui influencent l'attachement à une surface tels que les caractéristiques des souches microbiennes ainsi que le pH, la température, la composition, la rugosité de la surface d'adhérence, le type de matériaux et la concentration en électrolyte (Zheng *et al.*, 2021). En effet le pH à travers son caractère acide ou basique influence la croissance et le développement du biofilm en réduisant les forces de vanderwaals qui jouent un

rôle dans l'attachement initial des bactéries à la surface (**Flemming et al., 2016**). De plus les températures élevées favorisent l'adhésion du biofilm à la surface des matériaux.

Une fois le biofilm formé, il a été question d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de *Streptomyces spp.* sur l'isolat potentiel de *Vibrio* ayant formé le plus de biofilms (I₃G). Les tests ont révélé des résultats qui se traduisent par des diamètres d'inhibitions différents. L'absence de diamètre d'inhibition peut être attribuée à la quantité de composés antimicrobiens spécifiques produits par des *Streptomyces* contre *Vibrio*, ou à leur génétique et à leur voie métabolique spécifique. De plus, les espèces du genre *Vibrio* possèdent un mécanisme de résistance via le plasmide contre les composés antimicrobiens produits par certains *Streptomyces*. Ils peuvent donc transférer la résistance via des processus tels que la conjugaison, la transformation et d'autres éléments stables ; Ce qui pourrait influencer leur activité antagoniste (**Raissy et al., 2012**). La différence significative entre les diamètres d'inhibitions des *Streptomyces*, s'expliquerait par divers paramètres à savoir ; l'interaction avec les autres microorganismes présents qui peuvent influencer l'expression de l'activité antagoniste, la concentration de composés bioactifs produits, la structure des composés et la résistance de l'isolat bactérien ciblée peuvent influencer la capacité d'inhibition (**Galet, 2014**). Toutefois l'un des extraits aqueux n'a pas montré d'activité antimicrobienne aux concentrations utilisées. Ceci peut être dû aux faibles concentrations en extraits utilisés dans cette étude, ou due à des changements de conditions de culture comme le pH, la température et la concentration inhibitrice minimale qui pourrait être inférieure au seuil d'inhibition de la croissance de *Vibrio*. L'inhibition de la croissance du pathogène par les extraits aqueux de Ker-2 est attribuée à une vaste gamme de composés bioactifs dont de nombreux antibiotiques, ou encore à la structure chimique de ces composés (**Manal et al., 2017**). Cependant l'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due uniquement aux constituants actifs mais aussi à l'action combinée de différents composés contenus dans cet extrait (**Essawi et al., 2000**).

L'activité anti-biofilms des extraits aqueux de Ker-2 à des concentrations doubles et simples montrent une efficacité d'inhibition. En effet les extraits de Ker-2 inhibent la formation des biofilms de *Vibrio* avec une efficacité de 48,7% pour la double concentration et 39,8% pour la simple concentration. Ce travail montre que les extraits aqueux de Ker-2 pourraient être constitués de nombreux composés actifs capables d'empêcher la formation du biofilm de *Vibrio*. Les composés actifs produits par les extraits peuvent se lier et bloquer les récepteurs spécifiques à la surface bactérienne à savoir adhésines, le pili, le fimbriae qui sont nécessaires à l'attachement initial aux surfaces ainsi stoppant l'adhésion et l'attachement cellulaire. Ce qui

cause l'interruption de la génération de la matrice extracellulaire, ainsi diminuant la production des facteurs de virulence et de résistance, et bloque le système de communication cellulaire Quorum Sensing et la formation du biofilm (**Sandra, et al., 2021**).

Ce travail montre ainsi que les composés actifs présents dans les extraits aqueux de *Streptomyces spp.* pourrait être une alternative intéressante dans la lutte contre les pathologies engendrée par la capacité de *Vibrio spp.* à former des biofilms.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Au terme de cette étude qui avait pour objectif général d'évaluer l'activité antimicrobienne et anti biofilm des extraits aqueux des *Streptomyces spp* vis-à-vis des *Vibrio spp.* isolés de l'espèce *Clarias gariepinus*.

- Deux isolats de *Vibrio* ont été isolés à savoir, l'espèce I₃G qui s'apparente au genre *Vibrio cholerae* et l'espèce I₁V qui s'apparente au genre *Vibrio vulnificus*. Les deux isolats ont eu la capacité à former des biofilms avec l'espèce I₃G ayant la plus grande quantité de biofilm formé a été retenu pour la suite du travail.
- 50% des isolats testés ont présenté une capacité à inhiber les isolats de *Vibrio*. les isolats les plus actifs étaient Ker-2 et Bel-12 avec des diamètres d'inhibition allant de 24,0±1.4mm et 23,5±2.1mm respectivement.
- Les extraits de Ker-2 inhibent environ 40% de la formation du biofilms.

PERSPECTIVES

- ✚ Tester la capacité des extraits secs de *Streptomyces* à détruire la formation de biofilms.
- ✚ Évaluer l'activité des extraits inorganiques et organiques.
- ✚ Comparer l'activité des extraits aqueux de *Streptomyces* vis-à-vis de *Vibrio* avec ceux des antibiotiques conventionnels sur la croissance de *Vibrio*.
- ✚ Réaliser un test sur le terrain.

RÉFÉRENCES

- Abhishek, C., Tanu, J. (2022).** Microbial Methods for Environment, Foods and Pharmaceutical Analysis. *Springer*. p 469.
- Angela, D., Valentina, T., Lucia, N., Giuseppina, T. (2010).** Comparison between thiosulphate-citrate bile salt sucrose agar and CHROMagar *Vibrio* for isolating *Vibrio parahaemolyticus*. *Food control*.1. pp1-4.
- Aubin, C., Adjo, T., Brice, J., Paul, D., Ama, A., Marina, K. (2024).** Prévalence et diversité des souches de *Vibrio* dans les eaux et les poissons des fermes aquacoles de la Lagune Ebrié. *International journal of Progressive Sciences and Technologies*.46. p312.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Koraichi, Ibnsouda, S. (2015).** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. *Journal of pharmaceutical Analysis*.6. pp71-79.
- Bérdy, J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*. 58. pp1-26.
- Ble, M., Alla, Y., Kervarec, F. (2008).** Régime alimentaire de trois principales espèces piscicoles élevées en Côte d'Ivoire. *Centre de Recherche Océanologiques*. pp12-13.
- Brian, A., Dawn, A. (2016).** Bacterial fish pathogens, disease of Farmed and Wild fish. *Springer*. p732.
- Bwirabuciza, L., Buhungu, S., Kamakune, S., Mulema, NV., Mukenge, N. (2024).** Alimentation de *Clarias gariepinus* du lac Albert et de la Lagune Nana en République Démocratique du Congo. *Bull science environ biodiverse*. 7. pp1-10.
- Cerri, M., and Badino, A. (2012).** Shear conditions in clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus* in tired tank and airlift bioreactors. *Bioprocess and Biosystems engineering*. 35. pp 977-984.
- Clutterbuck, A., Woods, E., Knottenbelt, D., Clegg, P., Cochrane, C., Percival, S. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 121. pp 1-17.
- Desmarchelier, P. (1997).** Pathogenic *Vibrios*. In A.D Hocking. Foodborne Microorganisms of public Health Significances. North Sydney, *Australian Institute of Food Science and technology Incorporated*. pp 285 -312.

- Devenish, J., Barnum, D. (2014).** Evaluation of the API 20E System for the identification of Gram-negative Nonfermenters from Animal Origin. *Journal of Comparative medicine*. 46. pp 80-81.
- Dillenseger, H. (2019).** Les bactériocines : en alternative aux traitements d'antibiotiques. Thèse. *Unité de Formation et de la Recherche des Sciences Pharmaceutiques*. Université de Bordeaux. p 75.
- Elvis, M., Moumbock, J., Armel, E. (2021).** Pourquoi la pisciculture tarde à se développer dans la ville de Bertoua (EST Cameroun). *International Journal of Biological Chemical Science*. 15. pp 2568-2580.
- Epiphane, S., Arsenène, F., Guy, A., Pèlagie, H., Alida, A., Antoine, C., Jules, A., Roh, L., Paul, H., Patrice, Y. (2016).** Aliments, ressource alimentaire et pratiques de nourrissage dans les exploitations piscicoles du Sud-Benin. *Centre de Recherche Agricoles à vocation nationale basé à Agonkanmey*. pp 18-19.
- Essawi, T., Srour, M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacologie*. 70. 343- 349.
- FAO. (2016).** Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2016 contribué à la sécurité alimentaire et la nutrition de tous Rome. *Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture*. p 244.
- FAO. (2022).** La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture vers une transformation bleue. Rome. *Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture*. p 251.
- Filloux, A. et Vallet, I. (2003).** Biofilm : Mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Medécine sciences* 19. pp 77-83.
- Flemming, H., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S., Kjelleberg, S. (2016).** Biofilms; an emergent form of bacterial life. *Nature reviews Microbiology*. 14. pp 563-575.
- Flemming, H., Wingender, J. (2010).** The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 8. pp 623-633.

- Galet, J. (2014).** Vers la compréhension des dialogues microbiens dans les écosystèmes du sol : étude de l'interaction entre *Streptomyces* et *Pseudomonas*. Thèse. Université de Lorraine. *HAL open Science*. p154.
- Géraldine, L., Kleine, A., Chantal, C. (2010).** De nouvelles voie d'inhibition des biofilms. *Matériaux et Technique*.98. p 2-4.
- Godwe, J. (2023).** Activité antimicrobienne des isolats d'Actinomycètes keratinolytiques. Mémoire. *Faculté des Sciences, Université de Yaoundé 1*. p 57.
- Gopalakrishnan, S., Prasanna, L. (2020).** *Streptomyces*-based cell factories for production of biomolecules and bioactive metabolites. *Beneficial Microbes in Agro Ecology*. 27. p 887.
- Halima, K., Archana, A., Vinay, K. (2022).** Catalase test; A Biochemical Protocol for Bacterial identification. *Agriculture Cooperatives*. 3. pp 53-54.
- Heather, J., Peter, I., Rutledge, J. (2022).** Recently discovered secondary metabolites from *Streptomyces* species. *Molecules*.27. p887.
- Ignace, C., Amy, G., Malang, S., Jaime, M. (2015).** Maitrise du risque lié à *Vibrio parahaemolyticus* dans les produits halieutiques destinés à l'exportation. *Biotechnologie Agronomie, Société et Environnement*. 19. pp 317-328.
- Ina, S., Aslah, M., Al-saari, A. (2019).** *Vibriosis* in Fish. A Review on Disease Development and Prevention. *Journal of Aquatic Animal Health* .31. pp 3-22.
- Jamal, M., Wilsal, A., Saadia, A., Fazal, J., Muhammad, I., Asif, M., Tahir, H., Muhammad, A., Rafiq, M., Atif, M. (2018).** Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of Chinese Medical Association*. 81. p2.
- Jaspal, K., Tooba, M., Rucha, A., Neha,K. 2020.** Inhibition of bacterial biofilms by *Streptomyces* derived extract. *Journal of biology and Today's World*. 9. pp 4-5.
- Jean F.B., Christian M., Eric, D., Christian, M., Abdenour, B., (2007).** Bactérioses des poissons. *Bulletin de l'académie vétérinaire de France*. 160. pp53-56.
- Jean-Francois, D., Isabelle, P. (2013).** Poisson d'eau douce du Québec et des maritimes. *Michel Quintin*. p472.

- Jepri, A., Muhammad, E., Genia, S., Wani, D., Theresia, Y., Ai-Ika, A., Elaeisa, A., Zetryana, P., Tjandrawati, M. (2022).** The antibacterial and ant biofilm potential of *Paederia foetida* Linn. leaves extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* .12. pp 117-124.
- Jhon, W., Antido, A., Freshthel, M., Climacosa, M. (2022).** Enhanced Isolation of *Streptomyces* from different soil habitats in Calamba city, laguna, Philippines using a modified integrated approach. *International Journal Microbiology* 10. pp1-7.
- Jodi, W., Fei, L., Priyia, P., Nurul, S., Sunny, H., Bey-Hing, G., Learn-Han, L. (2019).** A review on Mangrove Actinobacterial Diversity: The roles of *Streptomyces* and Novel species discovery. *Progress in Microbes Molecular Biology*. 2. p10.
- Kathivel, B., Felix, L., Eleftherios, M., Sabarathinam, S., Tikendra, N. (2020).** Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*. 96. pp 50-51.
- Kenfack, J., Christian, D., Jean, C. (2019).** La pisciculture au Cameroun: bilan et perspectives. *International journal Biology Chemistry and Sciences*. 13. pp1141- 1142.
- Kone, M. (2015).** Biosécurité en pisciculture et contrôle du parasite *Argulus* sp. Pour une amélioration de la production du tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* (Linneaus 1758) de Cote d'ivoire. Thèse. *Université de Nangui Abrogoua*. p 234.
- Larasati, A., Ryandini, D., Oedjijono, O., Kusharyati, D., (2021).** Optimisation of medium and incubation time in the production of Antibacterial compounds by *Streptomyces* sp. SA404. *Advanced in Biological Sciences Research*. 15. p 7.
- Lebeaux, D., Beloin, M. (2014).** Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter. *Journal des anti- infectieux*. 16. pp112-121.
- Leighton, R., Liyan, X., Gracie, K., Grace, M., Guoshuai, C., Robert, S., Alan.W. (2023).** *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio Vulnificus* in vitro biofilm dispersal from microplastics influenced by simulated human environment. *Frontier Microbiology*. 14. pp 14-15.
- Lewis, K. (2008).** Multi Drug tolerance of biofilms and persister cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322. p107.

- Manal, K., Mohammed, A., Mohammed EL, B., Said, B., Haiat, E. (2017).** Efficacité des extraits aqueux des plantes aromatiques et médicinales contre la pourriture grise de la tomate du Maroc. *Compte rendus Biologies*. 340. p392.
- Messaoudi, O. (2020).** Isolement et caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir d'actinomycètes isolés du sol Algérien. Thèse. *Université ABOU BARK BELKAID de Tlemcen*. p445.
- MINEPIA. (2021).** Annuaire statistique du sous-secteur de l'élevage des pêches et des industries animales. p60.
- Mohammadjavad, P. (2013).** Isolation and differentiation of *Vibrio* species from seafood and molecular characterisation of *Vibrio parahaemolyticus*. Mémoire. *University of Malaya Kuala Lumpur*. p132.
- Moreira, M., Schrama, D., Farinha AP., Cerqueira, M., Raposo, M., Carrilho, R., Rodriguezs, P. (2021).** Fish pathology research and diagnosis in aquaculture of farmed fish. *Animals*. 11. p125.
- Nana, T., Tchoffo, Z., Kpoumie, N., Songmo, B.L., Zango, P., Efole, E.T., Minette E.T. (2024).** Caractérisation des écloséries de production des poissons d'eau douce dans la Région du Centre Cameroun. *Applied Biosciences*, 1. p196.
- Na-Nkorn et Brumet (2009)** Poisson chat nord-africain. *Clarias gariepinus*. FAO: North African catfish. *Es-peze-gato*. p1.
- Odeomelam, H., Wemedo, S., Akani, N., Douglas, S. (2023).** Isolation and identification of *Vibrio* spp. from catfish (*Arius heudelotii*) harvested from New Calabar river in Rivers Stat, Nigeria. *South Asian Journal of Research in Microbiology*. 17. pp 22-23.
- Planquette, K., et Le Bail, P. (1996).** Atlas poisson d'eau douce de Guyane. *Collection du Patrimoine Naturel*. 22. p429.
- Poll, M et Gross, JP., (1995).** Generalités des poissons d'eau douce d'Afrique. Mémoire. *Académie royale de Belgique*. p324.
- Raissy, M., Moumeni, M., Ansari, M., Rahimi, I. (2012).** Antibiotic resistance pattern of some *Vibrio* strains isolated from seafood. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 11. p6.

- Rimstad, D., Dannevig, O., Falk .(2011).** Fish diseases and disorders viral, bacterial and fungal infections. *CABI Press*. 3. pp 143-165.
- Ruan et Jisheng. (2013).** Bergey's Manual of systematic Bacteriology (second edition) volume 5 and the study of Actinomycetes Systematic in China. *Journal of Acta Microbiologica Sinica Institute of Chinese Academy of Sciences*. 53. 521-530.
- Saffroy, S. (2006)** Étude du métabolisme Carboné chez *Streptomyces spiritinaespiralis*. Thèse. *Institut Polytechnique de Lorraine France*. pp6-14.
- Sandra, P., Cristobal, N., Olga, B., Raul, R. (2021).** Application of antimicrobial compounds for the control of phytopathogens. *Frontier in Sustainable Food System*. 5. p13.
- Sauer, K., Camper, A., Ehrlich, G., Costerton, J., Davies, D. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology* .184. pp1140 -1154.
- Shakeel, Q., Lyu, A., Zhang, J., Wu, M., Li, G., Hsiang, T., Yang, L. (2018).** Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanuts kernels using *Streptomyces yanglinensis*. *Frontiers in Microbiology*. 9. pp3-10.
- Shields, P., Cathcart, L. (2010).** Oxidase Test Protocol. *American Society for Microbiology*. p 3-4.
- Shuyang, H., Yuwei, L., Boran, W., Lijun, Y., Xin, J. (2022).** Effect of NaCl concentration on the behavior of *Vibrio brasiliensis* and transcriptome analysis. *Foods*. 11. p840.
- Stepanovic, V., Dakic, I., Savic, B., Svabic, V. (2000).** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiology Methods*.40. pp 175-179.
- Sylvia, V. (2022).** Norcadia, Rhodococcus, *Streptomyces* and other Aerobic Actinomycetes. *Reference module in biomedical science*.1. pp 589-613.
- Tilusha, M., Mohammad, N., Amal, A., Annas, S., Mohd, Z. (2023).** Pathology and pathogenesis of *Vibrio* infection in fish. *Article in aquaculture reports*. 28. pp3-4.
- Tremblay, Y., Hathroubi, S., Jacques, M. (2014).** Les biofilms bactériens : Leurs importance santé animale et en santé publique. *The Canadian Journal of Veterinary Research* .78. pp 110-116.

- Zé, A.L. (2024).** Activités antimicrobienne des extraits de *Streptomyces spp.* vis-à-vis de *Xanthomonas phaseoli pathovar manihotis* (agent responsable de la bactériose vasculaire du manioc). Mémoire. *Faculté des Sciences, Université de Yaoundé 1*. p54.
- Zheng, S., Marwa, B., Atul, D., Hye-Eun, K., Joseph, H., Geelsu, H. (2021).** Implication of surface properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial surface Sensing and Their initial Adhesion. *Frontier in Bioengineering and biotechnology*. 9. p22.

ANNEXES

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES

Kuster amidon

Amidon	5g
Peptone	0,3g
K ₂ HPO ₄	2g
KNOH ₃	2g
Chloruresodium	2g
Oligoéléments	1ml
Agar	18g
pH	7,00

Oligo-éléments

Sulphate de magnésium	5g
Carbonate de calcium	2g
Sulfite de fer	1g

Bouillon nutritive

Peptone	10g
Extrait de viande	5g
Chlorure de sodium	5g
Ph	7

Gélose Mueller-Hinton

Peptone	17,5g
Amidon	1,5g
Macération de viande de bœuf	4,0g
Agar	15,0g

TCBS (Thiosulphate citrate bile salts- sucrose)

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
Saccharose	20g
Thiosulfate de sodium	10g
Citrate de sodium	10g
Chlorure de sodium	10g
Oxgall	5g
Citrate ferrique	1g
Bleu de thymol	0,04g
Cholate de sodium	3g
Bleu de bromothymol	0,04g
Agar	15g
Ph	8,6± 0,2