

RÉSUMÉ DE LA THÈSE DE DOCTORAT

élaboré par **Mihai Bogdan NICOLCIOIU** sous la direction de **Mme Maître de Conférence Dr. Habilité Florentina MATEI**

« LA CARACTÉRISATION DE CERTAINES ESPÈCES DES MACROMYCÈTES UTILES DU POINT DE VUE BIOTECHNOLOGIQUE »

Mots-clés : macromycètes, cultures submergées, biomasse fongique, corps de fructification, extraits éthanoliques, activité antimicrobienne, polyphénols, flavonoïdes, enzymes ligninolytiques, biodégradation, variabilité génétique, marqueurs moléculaires.

Cette thèse de doctorat inclut les recherches menées au cours de la période 2015-2018 à la Faculté des Biotechnologies de l'USAMV Bucarest dans les laboratoires de génétique, de biologie moléculaire et de microbiologie appliquée.

Les champignons sont bien connus dans le monde entier pour leurs valeurs nutritionnelles et thérapeutiques en raison de leurs produits métaboliques. Parmi les nombreuses molécules synthétisées par les macrophages, il y a des composés bioactifs tels que les polysaccharides, les terpénoïdes, les lectines, ainsi qu'une grande variété de protéines ayant des actions biologiques d'intérêt, dont beaucoup ont un potentiel biotechnologique précieux qui peut être exploité en médecine, l'industrie ou dans la bioremédiation de l'environnement.

Dans la présente thèse, les thèses portaient sur l'exploitation biotechnologique de certaines espèces de champignons commerciales ou de notre flore spontanée à valeur nutritive et / ou médicinale, ce qui conduirait à la diversification de la gamme de champignons tant pour le marché intérieur que pour les produits destinés à l'exportation, pour l'obtention de compléments nutritionnels nutritionnels et thérapeutiques ou pour leur utilisation en biodégradation. On a considéré que les champignons comestibles / sauvages étudiés pouvaient être utilisés dans l'industrie alimentaire ou pharmaceutique ou pour la préservation et la régénération de l'environnement à la suite des résultats obtenus. À cet égard, nous avons visé l'évaluation

biotechnologique de dix espèces de macromycètes du commerce ou de notre flore spontanée à valeur nutritive et / ou médicinale, dont certaines moins connues et moins exploitées dans notre pays. Ces espèces sont: *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus eryngii* souche 2600, *P.ostreatus* var. Florida, *Trametes versicolor*, *Hericium coralloides*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Agaricus campestris*, *Laetiporus sulphureus*.

Afin d'atteindre l'objectif proposé, les objectifs de recherche suivants ont été abordés:

- Production in vitro de matériel fongique - la source d'inoculum - à partir d'espèces fongiques jugées utiles sur le plan biotechnologique;
- Évaluation du potentiel de croissance des champignons en conditions submergées et des conditions de culture pour la production de biomasse fongique;
- Évaluation de l'activité antimicrobienne d'extraits à l'éthanol préparés à partir de biomasse fongique obtenue in vitro dans des conditions immergées;
- Analyse biochimique des extraits de champignons obtenus à partir de fructifications de champignons;
- Étude in vitro du potentiel biotechnologique de certaines espèces de macromycètes pour leur utilisation dans la biodégradation de polluants organiques (colorants et hydrocarbures aromatiques);
- Caractérisation moléculaire de certaines souches de macromycètes d'intérêt biotechnologique.

La thèse est structurée en deux parties: la première partie, composée de quatre chapitres, aborde les études bibliographiques sur l'état actuel des connaissances sur les questions abordées dans le document; la deuxième partie, qui compte 8 chapitres, présente la contribution personnelle à la réalisation des objectifs proposés.

Les études bibliographiques ont abordé un certain nombre de questions qui seront présentées ci-dessous.

Le premier chapitre aborde les aspects économiques de la culture des champignons comestibles et médicinaux aux niveaux mondial et national, en soulignant l'impact social et environnemental des technologies de culture.

Au **chapitre II**, les propriétés nutritionnelles et médicinales d'autres espèces majeures de macromycètes sont mises en évidence, mettant en évidence les principaux composés bioactifs d'intérêt biotechnologique.

Considérant que la partie expérimentale a abordé une série de techniques de biologie moléculaire pour la caractérisation d'espèces d'intérêt, le **chapitre III** décrit les techniques moléculaires utilisées pour identifier les espèces de macromycètes.

Le **chapitre IV** traite des applications industrielles et biotechnologiques potentielles des enzymes isolées à partir de macromycètes (enzymes lignolytiques), en décrivant leur mode d'action.

La **contribution personnelle** est détaillée dans 6 chapitres expérimentaux, en corrélation avec les objectifs principaux de la thèse, précédés par un chapitre présentant la motivation et le contexte de la recherche et finalisé par un chapitre de conclusions générales de ces recherches. Les six chapitres expérimentaux, après une brève introduction au sujet d'intérêt, présentent un sous-chapitre décrivant la méthodologie utilisée, suivi des résultats et des discussions et finalisant avec une série de conclusions partielles des recherches.

Ainsi, le **chapitre V** décrit le contexte des expériences, mentionne la motivation et les objectifs généraux, les emplacements des expériences et les équipements dans ces emplacements.

Au **chapitre VI**, l'objectif était d'obtenir in vitro le matériel fongicide en tant que source d'inoculum à partir de l'espèce fongique considérée comme étant utile sur le plan biotechnologique. Il a été conclu que les milieux de culture solides testés, respectivement PDA et MEA, étaient optimaux pour obtenir l'inoculum fongique de toutes les espèces de macromycètes étudiées. Des exceptions ont été faites par *Agaricus campestris* et *Hericiium coralloides*, pour lesquels le MEA était plus propice à la croissance mycélienne. Le matériel biologique obtenu sur un milieu synthétique solide a été utilisé comme source d'inoculum pour des expériences ultérieures.

Le **chapitre VII** abordait l'évaluation du potentiel de croissance des champignons en conditions d'immersion et optimales pour la culture de la biomasse fongique, à savoir la composition chimique du milieu de culture et l'influence de l'évolution du pH sur la production de biomasse. Par rapport aux milieux solides, les cultures liquides ont l'avantage d'obtenir une grande quantité de biomasse micellaire sur une courte période de temps dans un espace restreint. Parmi les 10 types de champignons étudiés, les espèces de *Ganoderma* présentaient le plus grand potentiel de production de biomasse en conditions submergées dans les 6 variantes de milieux testés, et *Lentinus edodes* avait le potentiel le plus faible. On a constaté que la mesure des variations de pH au cours de la période de croissance mycélienne avait diminué progressivement

(dans le cas de cultures sur des milieux ME et PD) ou augmentée progressivement (dans le cas de la culture PMP), l'espèce testée ayant la capacité de tourner le pH vers l'environnement en fonction des métabolites extracellularisés. La diminution la plus radicale par rapport au pH initial a été enregistrée chez *Laetiporus sulphureus* dans les milieux de culture ME et PD (à partir d'un pH initial de 5,4 et de 5,0 à un pH de 2,8 respectivement). D'une manière générale, il a été constaté qu'une acidification du milieu de culture (à pH 3,27) entraînait une réduction de la biomasse. Les environnements riches en glucose (2%) ont une influence favorable sur la production de biomasse. Ainsi, sur le milieu MCM, le rendement maximal en biomasse a été obtenu pour *L. sulphureus*, *P. ostreatus* Florida et *F. velutipes*, et le milieu PD était favorable pour obtenir la biomasse maximale pour l'espèce: *L. edodes*, *G. applanatum*, *T. versicolor* et *H. coralloides*.

Au **chapitre VIII**, l'activité antimicrobienne de certains extraits éthanoliques préparés à partir de biomasse fongique obtenue in vitro dans des conditions submergées, filtrées et sèches a été évaluée. Les résultats ont montré que les extraits éthanoliques de *G. applanatum*, de *L. sulphureus*, de *F. velutipes*, de *T. versicolor*, de *H. coralloides* et de *A. campestris* avaient des activités inhibitrices significatives, en particulier sur *B. subtilis* subsp. *spizizenii*. Aucun des extraits de champignons testés ne présentait d'activité antimicrobienne lors de l'interaction avec les levures pathogènes *Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida parapsilosis* CBS604.

Chapitre IX: Analyse biochimique des extraits hydroalcooliques obtenus à partir de fructifications de champignons. La teneur totale en polyphénols et en flavones dans les extraits de champignons a été évaluée par des méthodes spectrophotométriques, en corrélation avec la chromatographie en couche mince (CCM), ainsi que la teneur en enzymes ligninolytiques. La teneur la plus élevée en phénols a été enregistrée pour l'extrait de *A. campestris* et *P. ostreatus* var. Florida. L'analyse TLC a relevé que toutes les extraites fongiques présentent des spots de fluorescences caractéristiques pour les flavones C-glycosidiques orietine et vitexine. En ce qui concerne l'activité enzymatique, les espèces ayant enregistré une augmentation de la valeur de la manganèse-peroxydase (MnP) étaient *P. ostreatus* var. Florida, suivis de *A. campestris*, *G. applanatum* et *L. sulphureus*; La lignine peroxydase (LiP) a eu une activité accrue dans tous les isolats fongiques testés, les valeurs les plus élevées ayant été observées pour *A. campestris*, *P. ostreatus* var. Florida, *T. versicolor* et *F. velutipes*. La plus forte activité lacase enregistrée chez *P. ostreatus* var. Florida.

Le **chapitre X** décrit l'étude *in vitro* du potentiel biotechnologique de certaines espèces de champignons pour décolorer certains colorants utilisés dans l'industrie textile. Le potentiel des souches de *P. ostreatus* à dégrader le pétrole brut du milieu de culture a été évalué. Parmi tous les échantillons testés, seuls *T. versicolor*, *P. ostreatus* var. Florida et *G. applanatum* ont montré une capacité de blanchiment sur tous les colorants de type Bemacid. En ce qui concerne le colorant Red Congo (CR), aucun extrait de ceux qui ont été testés n'a perdu d'effet décolorant. Les souches de *Pleurotus ostreatus* se sont adaptées différemment à la présence du préloï dans le milieu de culture et ont présenté des degrés de développement différents. Dans toutes les variantes expérimentales, il a été noté que le mycélium développé sur des milieux traités au pétrole présentait une couleur brun foncé par rapport à la couleur blanc-gris typique du champignon, ce qui signifie que *P. ostreatus* avait la capacité d'éliminer le polluant en l'accumulant dans les organismes de fructification.

Le **chapitre XI** traite de la variabilité génétique dans le cas des souches commerciales de *Pleurotus* sp. provenant de différentes zones géographiques et leur lien génétique avec des isolats indigènes de *Pleurotus ostreatus*. Des analyses moléculaires avec des marqueurs β -tubuline ont révélé l'existence d'un polymorphisme au niveau intra et interspécifique. Toutes les variétés de champignons commerciaux européens étaient similaires et comparables à l'isolat naturel en Roumanie. Des différences significatives ont été observées entre les souches européennes et américaines. La conclusion générale est que la diversité génétique parmi les populations de macromycètes est étroitement liée à leur distribution géographique.

Dans le dernier chapitre, **chapitre XII** sont présentées les conclusions qui résultent des résultats obtenus à partir des analyses expérimentales effectuées.

La nouveauté et l'originalité de la thèse comprennent les aspects suivants: analyse d'un nombre important et varié d'espèces de champignons isolées ayant des propriétés nutritionnelles / médicinales; culture immergée et établissement d'environnements de culture optimaux pour obtenir le rendement maximal en biomasse fongique chez certaines espèces sauvages telles que *L. sulphureus*, *Ganoderma* spp, *F. velutipes*, *L. edodes*, *T. versicolor*, *H. coralloides* et d'autres espèces. Des environnements de culture submergés optimaux ont été établis pour les espèces de macromycètes étudiées, qui, optimisées, pourraient produire de grandes quantités de biomasse et de composés bioactifs de grande valeur dans les processus biotechnologiques.