

RESUME

de la thèse de doctorat intitulée:

IMPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DE CERTAINES OXYDOREDUCTASES D'ORIGINE MICROBIENNE

Doctorant: **ALBU (PROCA) Cristina-Valentina**

Directeur scientifique: **Prof. Univ. Dr. CORNEA Petruța-Călina**

MOTS-CLES: *Trichoderma*, laccase, peroxydase de lignine, peroxydase de manganèse, antitumoral, clarification des jus

Les oxydoréductases représentent cette classe d'enzymes qui catalysent les réactions d'oxydoréduction qui se produisent dans les organismes vivants. La laccase appartient à la famille des polyphénol oxydases et est très importante pour l'élimination des polluants de l'environnement en raison de ses propriétés structurales et fonctionnelles. Récemment, la capacité de la laccase à oxyder des substances phénoliques et non phénoliques a été prise en compte par de nombreux chercheurs. Bien que les champignons filamenteux produisent de grandes quantités de laccase, la production à l'échelle industrielle rencontre encore de nombreux problèmes. Actuellement, les chercheurs tentent d'augmenter l'efficacité et la productivité de la laccase et de réduire son coût final, en trouvant des microorganismes appropriés et en améliorant le processus de production et de purification de la laccase.

Compte tenu des aspects mentionnés ci-dessus, l'objectif principal de ce travail a été de sélectionner des microorganismes producteurs d'enzymes oxydoréductases, en particulier la laccase, d'optimiser le processus d'obtention de l'enzyme, de la caractériser et de tester différentes applications de celle-ci.

La partie bibliographique est structurée en trois chapitres, dans lesquels sont présentées les oxydoréductases, en tant que groupe principal d'enzymes, avec un focus sur la laccase, la peroxydase de manganèse et la peroxydase de lignine, complétée par les informations les plus récentes concernant les microorganismes rapportés comme producteurs d'oxydoréductases/laccase, les méthodes d'obtention et de purification, ainsi que les applications des laccases dans différentes industries (alimentaire, pharmaceutique, bioremédiation).

La partie expérimentale a été axée sur quatre grands objectifs, structurés en cinq chapitres, complétés par un chapitre de conclusions et perspectives.

Le premier chapitre expérimental (chap. 4) présente les résultats de la sélection de certaines souches de micromycètes et macromycètes potentiellement productrices d'enzymes laccasiques, en corrélation avec l'optimisation de la méthode de criblage en plaque, par l'ajout de guaiacol comme inducteur. Le criblage a été réalisé sur des souches fongiques appartenant aux genres *Aspergillus*, *Botrytis*, *Neurospora*, *Penicillium* et *Trichoderma*, ainsi que sur des souches de macromycètes appartenant aux espèces *Agaricus bisporus*, *Pleurotus sp.*, *Ganoderma lucidum* et *Laetiporus sulphureus*.

À la suite de cette recherche, nous avons identifié deux souches appartenant au groupe des micromycètes (champignons filamenteux) comme étant positives pour la production de laccase, à savoir *Trichoderma sp. MI2* et *Trichoderma sp. CP*. Les deux souches de *Trichoderma spp.* ont présenté une activité laccasique élevée à la concentration de 0,025% de guaiacol. Une concentration élevée de la solution de guaiacol (0,1% à 1%) peut inhiber le développement des micromycètes. Il a été conclu que lors du criblage en plaque, il est recommandé d'utiliser des concentrations de guaiacol plus faibles, allant de 0,01% à 0,075%.

À la suite des résultats obtenus dans cette étude, il a été conclu que la souche de *Pleurotus* est productrice d'enzymes laccasiques, souche provenant des déchets d'un supermarché. Après culture sur milieu PDA supplémenté avec une solution de guaiacol, la concentration optimale pour la souche de *Pleurotus* a été de 0,025%. Dès les premières 24 heures, la souche a montré une activité laccasique élevée, car l'apparition du halo rouge brique a eu lieu immédiatement après l'ensemencement.

Le chapitre suivant (chapitre 5) présente les deux souches de *Trichoderma* sélectionnées précédemment au niveau de l'espèce, par des techniques de biologie moléculaire. L'approche moléculaire pour l'identification des deux souches a été celle de l'amplification des fragments conservés ITS1-ITS4, suivie de l'application de la technique PCR-ITS-RFLP, corrélée avec les résultats du séquençage. Après amplification de l'ADN bactérien avec la paire de primers ITS1/ITS4, une seule bande a été obtenue, dont la taille est d'environ 600 pb.

Pour l'identification et la discrimination des souches de *Trichoderma*, une combinaison de trois endonucléases (*SduI*, *Hinfl* et *HhaI*) a été utilisée. Les produits de PCR n'ont pas été clivés avec l'enzyme de restriction *SduI*. Les deux souches ont présenté le même profil de restriction, à savoir : en utilisant l'enzyme de restriction *Hinfl*, trois fragments de restriction ont été obtenus, et en utilisant l'enzyme de restriction *HhaI*, quatre fragments de restriction ont été obtenus, dont la taille correspondait au profil de restriction théorique pour *Trichoderma* sp.

Les souches ont été identifiées par séquençage de la région 5,8S-ITS comme étant *Trichoderma asperellum*, avec un pourcentage d'identité de 100% avec de nombreuses séquences de *T. asperellum* existant dans la base de données.

Le chapitre suivant (chapitre 6), l'un des plus consistants, inclut une série de tests préliminaires et d'optimisation de l'activité oxido-réductase en conditions de laboratoire, en milieu liquide, en présence ou en absence d'inducteurs. Plusieurs variantes expérimentales ont été réalisées. Dans une étape préliminaire, l'influence du pH sur l'activité enzymatique en présence de guaiacol, ainsi que l'influence de la présence de CuSO_4 comme inducteur, ont été testées. Ensuite, l'optimisation de l'activité enzymatique en présence de CuSO_4 comme inducteur a été réalisée, suivie de l'optimisation de l'activité de la manganèse-peroxydase et de la lignine-peroxydase par l'inclusion de MnSO_4 et d'alcool vératryl dans le milieu.

Les tests préliminaires ont montré que l'activité oxido-réductase (laccasique, lignine-peroxydase et manganèse-peroxydase) la plus élevée a été enregistrée dans les cultures avec un pH initial de 8; l'ajout de guaiacol comme inducteur augmente légèrement l'activité enzymatique. La présence de l'inducteur CuSO_4 à une concentration de 1 mM dans le milieu M7 et de 2 mM dans le milieu PDB a déterminé une augmentation de l'activité laccasique.

Lors de l'optimisation, la présence de l'inducteur $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ à une concentration de 1 mM a permis d'obtenir, pour les deux souches de *Trichoderma*, une activité de la manganèse peroxydase de plus de 1 U/mL après 72 heures d'incubation. L'utilisation d'alcool vératryl à une concentration de 2 mM a permis d'obtenir, pour les deux souches de *Trichoderma*, une activité de la lignine peroxydase de plus de 1 U/mL après 96 heures d'incubation.

Les deux chapitres suivants abordent les applications pratiques de l'utilisation des complexes enzymatiques oxido-réducteurs. Le chapitre 7 présente l'étude visant à tester deux souches commerciales de laccase (*Trametes versicolor* et *Trametes hirsuta*) sur la lignée cellulaire HT-29, une lignée cellulaire cancéreuse humaine dérivée d'un adénocarcinome colorectal avec une morphologie typiquement épithéliale. Pour déterminer la dose de travail, la viabilité des cellules HT-29 a été évaluée par le test spectrophotométrique quantitatif MTT, après 24 heures d'exposition au traitement avec 11 dilutions des laccases commerciales. Il a été observé que la plus forte concentration d'enzyme (1 mg/mL) inhibe le développement des cellules tumorales par rapport au témoin, les différences entre les deux laccases n'étant pas significativement distinctes. Ainsi, les laccases commerciales inhibent la viabilité des cellules tumorales de 25 à 40%.

Le dernier chapitre expérimental (chapitre 8) avait pour objectif de tester l'effet de la laccase sur la teneur totale en polyphénols du jus de pomme pendant une période de stockage de 7 jours en conditions de

réfrigération, en corrélation avec l'évolution de l'activité antioxydante, les polyphénols étant connus pour leur effet antioxydant, mais aussi pour être les principaux facteurs impliqués dans la dégradation des jus de fruits, causant turbidité, intensification de la couleur, altérations du goût et de l'arôme et formation de sédiments, affectant la durée de conservation des produits et la perception des consommateurs.

Les tests réalisés ont montré une diminution accélérée de la teneur totale en polyphénols dans les échantillons de jus de pomme traités avec de la laccase, comparativement à l'échantillon témoin, qui a montré une diminution plus lente. Les échantillons de jus de pomme traités avec de la laccase commerciale à différentes concentrations (LC 0,5%, LC 1% et LC 1,5%) ont présenté une réduction significative de la teneur totale en polyphénols, après 3 jours de stockage, celle-ci étant réduite de 80% par rapport au moment initial.

Les complexes enzymatiques de laboratoire obtenus avec *Trichoderma* TdMI2 et *Trichoderma* TdCP, à une concentration de 1,5%, ont montré une teneur en polyphénols de 56 à 61% inférieure à celle du moment initial après 7 jours. Un effet négatif de l'utilisation de la laccase dans le traitement des jus de pomme serait le brunissement de ceux-ci causé par la formation d'oligomères par dénaturation des polyphénols, composés qui pourraient néanmoins être éliminés par une centrifugation ultérieure.

Concernant les éléments de nouveauté, les espèces de *Trichoderma* ont été très peu étudiées en rapport avec la production d'oxido-réductases, en particulier de laccase. Pour la première fois, des souches de *Trichoderma asperellum* potentiellement productrices de laccase ont été rapportées. Il est à noter que ces souches ont été isolées et conservées par l'équipe de recherche de la Faculté de Biotechnologies de l'USAMV Bucarest.

Au niveau de l'optimisation de l'activité enzymatique, l'utilisation d'inducteurs tels que $MnSO_4$ et l'alcool vératryl n'a pas été rapportée jusqu'à présent pour l'induction de l'activité oxido-réductase (laccase, lignine peroxydase et manganèse peroxydase) chez l'espèce *Trichoderma asperellum*.

En accord avec les recherches actuelles au niveau mondial, la première inhibition des lignées tumorales d'adénocarcinome du côlon (HT29) à l'aide de laccase d'origine microbienne a été réalisée au niveau national, avec des résultats positifs et encourageants.

Pour la première fois, un complexe enzymatique provenant de *Trichoderma asperellum* avec un potentiel élevé d'utilisation dans la clarification du jus de pomme a été rapporté.