

RÉSUMÉ

de la thèse doctorale intitulée :

IMPACT DE *BOLETUS EDULIS* SUR LE MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN ET *SALMO SALAR*, AVEC LE TRANSFERT DE GÈNES DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ *SALMO SALAR*

Doctorant : Alexandru-Stefan Barcan

Directeur de recherche : Prof. Univ. Dr. Emanuel Vamanu

MOTS-CLÉS: Champignons, *Boletus edulis*, Microbiote intestinal, *Salmo Salar*, Systèmes in-vitro, Plasmide, Conjugaison bactérienne

Les champignons ont longtemps été appréciés pour leurs bienfaits nutritionnels et médicaux, les polysaccharides étant une composante clé de leurs propriétés de promotion de la santé. Ces glucides complexes, trouvés en abondance dans les champignons, servent de source de nourriture pour les bactéries bénéfiques dans l'intestin des animaux. En nourrissant ces bactéries, les polysaccharides de champignons aident à maintenir un microbiote sain, essentiel à la santé générale, y compris pour une digestion améliorée et une fonction immunitaire renforcée. De plus, comprendre comment la résistance antimicrobienne (AMR) se propage est crucial, car elle représente une menace significative pour la santé humaine et animale. Cette thèse de doctorat explore le potentiel de *Boletus edulis* (BEE), un champignon sauvage connu pour ses propriétés culinaires et médicinales, à influencer le microbiote intestinal tant chez les humains que chez le saumon atlantique (*Salmo Salar*). L'étude vise à évaluer l'impact de BEE sur la santé intestinale, ses propriétés prébiotiques et antioxydantes, et son rôle dans la modulation du transfert des gènes de résistance antimicrobienne (AMR) en utilisant des systèmes avancés de simulation intestinale artificielle. Les objectifs de la thèse étaient les suivants : (i) réaliser une revue systématique en consultant les recherches les plus récentes dans le domaine pour évaluer l'impact des polysaccharides de champignons sur le microbiote intestinal, les réponses immunitaires et le transfert de résistance antimicrobienne ; (ii) comparer l'extrait de *Boletus edulis* à d'autres espèces de champignons et utiliser un simulateur gastro-intestinal avancé ; (iii) tester les effets de l'extrait de *Boletus edulis* sur le microbiote intestinal humain affecté par les antibiotiques en utilisant le système artificiel d'intestin ; (iv) évaluer l'impact prébiotique de différentes doses d'extrait de *Boletus edulis* sur le microbiote intestinal du saumon atlantique en utilisant un simulateur d'intestin artificiel ; et (v) investiguer les résultats potentiels lorsqu'une bactérie portant un plasmide multirésistant est introduite dans une communauté bactérienne et soumise à la pression sélective par un traitement antibiotique.

Sur la base de ces objectifs, les premiers chapitres bibliographiques présentent une revue systématique des études récentes dans le domaine pertinent, couvrant l'influence des polysaccharides de champignons sur le microbiote intestinal humain et celui du saumon atlantique. Ces chapitres soulignent également l'importance d'utiliser des systèmes intestinaux artificiels pour évaluer les effets prébiotiques et probiotiques sur une large gamme de microbes qui influencent la santé de l'hôte. La fiabilité de ces systèmes *in vitro* dans la simulation de la propagation de la résistance antimicrobienne (AMR) est également mise en évidence.

Le premier chapitre examine en profondeur le rôle des polysaccharides de champignons, en particulier leur impact sur la composition et la santé du microbiote intestinal chez les humains et les saumons. L'utilisation de systèmes intestinaux artificiels est explorée en détail, démontrant leur efficacité à identifier les effets prébiotiques et probiotiques dans diverses populations microbiennes. Ces systèmes offrent des

perspectives précieuses sur les interactions entre les composants alimentaires et le microbiote intestinal, aidant au développement d'interventions de santé ciblées.

Ensuite, le deuxième chapitre examine les perspectives génomiques sur les mécanismes de transfert des gènes bactériens. Les processus traditionnels de transfert horizontal des gènes, tels que la conjugaison, la transformation et la transduction, sont discutés aux côtés de mécanismes récemment découverts, comme la transposition et la vésiculation. Ce chapitre éclaire la manière dont les bactéries diffusent la diversité génétique, contribuant à la propagation de la résistance aux antimicrobiens. En intégrant ces découvertes, cette revue souligne le rôle crucial des études génomiques dans la compréhension et la réduction de la propagation de l'AMR, informant ainsi les futures recherches et stratégies d'intervention. Le premier chapitre de recherche évalue les bienfaits antioxydants de divers extraits de champignons et leurs effets sur le microbiote intestinal humain en utilisant un simulateur gastro-intestinal avancé. Reconnaisant les bienfaits significatifs pour la santé et les composés bioactifs des champignons, cette étude se concentre sur l'extraction de ces composés pour maximiser leur potentiel de santé. Les champignons sélectionnés incluent *Boletus edulis*, *Cordyceps militaris*, *Ganoderma lucidum*, *Inonotus obliquus*, *Hericium erinaceus* et *Lentinula edodes*, choisis pour leurs propriétés antioxydantes connues, leur teneur en polysaccharides et leurs bienfaits généraux pour la santé. Les conditions optimales d'extraction ont été établies grâce à une série de tests antioxydants, y compris l'activité de piégeage des radicaux DPPH, l'inhibition de la peroxydation lipidique et la détermination de la teneur totale en polyphénols. Les expériences ont été réalisées en triplicat pour assurer la fiabilité. L'étude a révélé que l'éthanol à 100°C améliorerait significativement l'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits de *Boletus edulis*. L'eau s'est avérée plus efficace pour *Cordyceps militaris*, *Hericium erinaceus* et *Ganoderma lucidum* dans les activités antioxydantes, tandis que l'éthanol était supérieur à des températures plus élevées pour certaines espèces. La recherche a impliqué des tests rigoureux des activités antioxydantes pour établir les conditions optimales d'extraction pour le BEE, y compris l'activité de piégeage des radicaux DPPH, l'inhibition de la peroxydation lipidique et la détermination de la teneur totale en polyphénols. Les résultats ont révélé que l'extraction à l'éthanol à 100°C améliore significativement l'inhibition de la peroxydation lipidique du BEE. Pour d'autres espèces de champignons comme *Cordyceps militaris*, *Hericium erinaceus* et *Ganoderma lucidum*, l'eau s'est avérée plus efficace pour les activités antioxydantes, tandis que l'éthanol était supérieur à des températures plus élevées pour certaines espèces. En utilisant des simulateurs intestinaux artificiels sophistiqués, l'étude a évalué la distribution et l'abondance des populations bactériennes dans des modèles intestinaux humains et de saumon. Ces simulateurs ont répliqué avec précision les conditions physiques et biochimiques de l'intestin humain et du saumon, offrant des perspectives sur la dynamique du microbiote influencée par le BEE. L'utilisation généralisée des antibiotiques pose des préoccupations significatives pour la santé publique, principalement en raison de la perturbation du microbiote intestinal humain et des conséquences négatives sur la santé. Cette étude visait à évaluer les effets *in vitro* d'un nouvel extrait de *Boletus edulis* (BEE) sur le microbiote intestinal humain, en particulier dans le contexte de la dysbiose induite par les antibiotiques.

L'enquête s'est concentrée sur plusieurs paramètres clés : la cytotoxicité, l'influence de l'extrait de *Boletus edulis* (BEE) sur les niveaux de cytokines (IL-6, IL-10, IL-1 β , TNF α) et sa capacité à moduler la composition du microbiote après un traitement antibiotique. Pour réaliser une évaluation complète, l'étude a impliqué des analyses détaillées du microbiome et des évaluations de la synthèse des acides gras à chaîne courte (SCFA). Concomitamment, l'étude a déterminé la teneur totale en polyphénols, la capacité antioxydante et la composition spécifique des polyphénols dans l'extrait de BEE. Les résultats ont indiqué que le BEE module efficacement le paysage microbien, favorisant un équilibre microbien plus sain et atténuant les réponses inflammatoires.

L'étude souligne le rôle prometteur de l'extrait de *Boletus edulis* (BEE) dans la restauration de l'équilibre du microbiote, la réduction de l'inflammation et la lutte contre les effets indésirables de l'utilisation des antibiotiques. Ces découvertes soutiennent l'exploration continue du BEE en tant qu'ingrédient alimentaire fonctionnel avec des bénéfices potentiels pour la santé, en particulier dans l'atténuation de la

dysbiose induite par les antibiotiques et la promotion de la santé intestinale générale sans nécessité de suppléments probiotiques.

L'étude examine les effets de l'extrait de *Boletus edulis* (BEE), un nouveau prébiotique, sur les communautés microbiennes dans l'intestin du saumon atlantique (*Salmo Salar*) en utilisant le système de simulation *in vitro* SalmoSim. Étant donné l'expansion rapide du secteur de l'aquaculture du saumon, avec une exposition significative aux facteurs de stress abiotiques et biotiques, il existe un besoin critique de stratégies pour améliorer l'efficacité de conversion des aliments, réduire les traitements médicaux, minimiser les déchets et améliorer la qualité du poisson. Les prébiotiques, en particulier le BEE, offrent des avantages potentiels en stimulant la croissance des bactéries bénéfiques dans l'intestin.

Trois répliques biologiques des échantillons intestinaux de saumon atlantique ont été traités dans des conditions anaérobies strictes pour maintenir l'intégrité microbienne. Les régimes expérimentaux contenant 5% et 10% de BEE ont été préparés, et les bioréacteurs SalmoSim ont été inoculés avec le microbiote intestinal. Les bioréacteurs ont été soigneusement contrôlés pour la température, le pH et le flux de nutriments pour simuler l'environnement intestinal *in vivo*.

L'étude a évalué la composition microbienne et la production de fermentation en réponse à la supplémentation en BEE. Les résultats ont montré des changements significatifs dans les communautés microbiennes, en particulier une augmentation des espèces bénéfiques de *Bacillus* dans le groupe à faible dose de BEE et une dominance du genre *Vibrio* dans le groupe à forte dose. De plus, une augmentation notable de la production d'acétate, essentiel pour la santé intestinale et les fonctions métaboliques, a été observée, tandis que les groupes témoins présentaient des niveaux plus élevés de butyrate et de 3-méthylbutyrate. La supplémentation en BEE a également réduit les niveaux d'ammoniac, essentiels pour la qualité de l'eau et la réduction de la toxicité dans les systèmes d'aquaculture.

Les constatations suggèrent que le BEE peut moduler le microbiote intestinal, augmenter les populations de bactéries bénéfiques, améliorer la production d'acides gras à chaîne courte et réduire les niveaux d'ammoniac, en faisant un supplément alimentaire précieux pour promouvoir la santé des poissons et la durabilité en aquaculture.

Les mécanismes de transfert horizontal des gènes (THG) jouent un rôle crucial dans la propagation de la résistance aux antimicrobiens (RAM) parmi les bactéries. Ce chapitre examine les processus traditionnels de THG tels que la conjugaison, la transformation et la transduction, ainsi que des mécanismes récemment découverts comme la transposition et la vésiculation. La compréhension de ces processus est essentielle pour concevoir des stratégies visant à atténuer la propagation de la RAM.

Ce chapitre évalue les effets antioxydants des extraits de divers champignons, en se concentrant particulièrement sur le *Boletus edulis*, et leur impact sur la microbiote intestinale humaine à l'aide d'un simulateur gastro-intestinal avancé. Les conditions optimales d'extraction ont été établies à travers des tests rigoureux, incluant l'activité de piégeage des radicaux DPPH, l'inhibition de la peroxydation lipidique et la détermination du contenu total en polyphénols. Les résultats ont révélé que l'extraction à l'éthanol à 100°C améliore significativement l'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits de *Boletus edulis*.

L'étude explore les effets du *Boletus edulis* (BEE) sur les communautés microbiennes de l'intestin du saumon atlantique (*Salmo Salar*) en utilisant le système de simulation *in vitro* SalmoSim. Des échantillons de microbiote intestinal de saumon ont été traités avec des régimes expérimentaux contenant 5% et 10% de BEE. Les résultats ont montré des changements significatifs dans les communautés microbiennes, avec une augmentation des espèces bénéfiques de *Bacillus* dans le groupe à faible dose et une dominance du genre *Vibrio* dans le groupe à forte dose. BEE a également réduit les niveaux d'ammoniac, améliorant ainsi la qualité de l'eau et réduisant la toxicité dans les systèmes d'aquaculture.

Ce chapitre étudie le transfert des plasmides conjuguatifs, spécifiquement le plasmide pM07-1, dans la microbiote intestinale du saumon atlantique, en présence de *florfenicolul*, un antibiotique largement utilisé en aquaculture. Utilisant les techniques Hi-C et de séquençage métagénomique, l'étude a identifié de nombreux événements de transfert de plasmides, incluant des transferts entre taxons Gram-négatifs et Gram-positifs.

Les résultats ont mis en évidence la persistance du plasmide en l'absence de *florfenicolul*, soulignant le rôle des *floRes* intestinaux comme réservoirs de RAM.

En conclusion, cette thèse met en évidence l'impact significatif du *Boletus edulis* sur la microbiote intestinale et ses applications potentielles en santé humaine et en aquaculture durable. Les résultats suggèrent la nécessité de poursuivre les études *in vivo*, d'optimiser les doses et d'explorer les effets mécanistiques de BEE sur la santé intestinale et la modulation immunitaire. De plus, l'étude souligne l'importance des interventions stratégiques pour réduire la propagation de la RAM en aquaculture, en exploitant les propriétés naturelles des aliments fonctionnels comme le *Boletus edulis*.

Les recommandations pour les recherches futures incluent des études à long terme *in vivo* pour évaluer les effets durables de BEE, l'optimisation des doses pour maximiser les bénéfices tout en minimisant les effets secondaires, et des études mécanistiques pour comprendre comment les composés spécifiques de BEE interagissent avec la microbiote intestinale et les réponses immunitaires. Des études comparatives entre différentes espèces devraient également être menées pour généraliser les découvertes et développer des applications plus larges en aquaculture durable. Des analyses métabolomiques approfondies pourraient aider à identifier les métabolites spécifiques produits en réponse à BEE, fournissant des informations sur les voies métaboliques influencées et leurs implications pour la santé de l'hôte.