

RÉSUMÉ

de la thèse de doctorat intitulée:

RECHERCHE SUR LA DIVERSITÉ ET LA BIOACTIVITE DES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES DANS LA FLORE SPONTANÉE IDENTIFIÉE SUR SOLS POLLUES PAR LES HYDROCARBURES

Doctorant: **GURĂU M. Lorena-Roxana**

Coordinateur scientifique: **Prof. univ. Dr. ILIE Leonard**

MOTS-CLÉS: *diversité, champignons endophytes, sols contaminés, mécanismes
biologiques, écologie*

Depuis les temps les plus anciens, la biologie évolutive a mis en évidence le lien étroit entre les champignons, les plantes et, par conséquent, toute la biosphère. Les problèmes mondiaux, tels que la dégradation de l'environnement et la perte de biodiversité, minent l'équilibre des écosystèmes et affectent directement la qualité de vie. Les endophytes, micro-organismes cachés à l'intérieur des plantes, représentent une ressource inexploitée au potentiel énorme dans divers domaines, de l'agriculture à la médecine.

La thèse de doctorat intitulée "**RECHERCHES SUR LA DIVERSITÉ ET LA BIOACTIVITÉ DES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES DANS LA FLORE SPONTANÉE IDENTIFIÉE SUR DES SOLS POLLUÉS PAR LES HYDROCARBURES**" constitue une analyse approfondie de l'importance de la communauté endophyte et de ses biomécanismes impliqués dans la dégradation de certains contaminants, dans des conditions de laboratoire.

La thèse de doctorat comprend deux parties totalisant quatre chapitres. La première partie comprend une revue de la littérature, tandis que la deuxième partie présente les recherches originales. La revue de la littérature comprend les deux premiers chapitres intitulés "**L'état actuel des connaissances concernant les communautés de champignons endophytes**" et "**Implication des communautés endophytes dans le processus de dégradation des hydrocarbures**".

Le premier chapitre présente une variété d'aspects liés aux micro-organismes endophytes et à leurs principes. Sur la base des études réalisées jusqu'à présent, des informations sont fournies concernant l'importance, la transmission, la colonisation, l'écologie, la distribution, l'interaction avec la plante hôte et l'applicabilité des champignons endophytes.

Le **chapitre II** présente des données sur la situation actuelle des sols pollués par les hydrocarbures en Roumanie, ainsi que les effets de la pollution par les hydrocarbures sur la flore spontanée et sur le sol. En outre, le chapitre est complété par des notions liées aux biomécanismes fongiques impliqués dans la dégradation des contaminants.

La deuxième partie de la thèse, détaillée en deux chapitres, présente l'objectif et les objectifs spécifiques de l'étude, le cadre naturel et les conditions climatiques, les matériaux et les méthodes utilisés, ainsi que les résultats obtenus concernant la diversité des communautés endophytes dans la flore spontanée et l'évaluation de leur bioactivité sous l'influence des facteurs étudiés.

L'objectif de cette thèse de doctorat était de mener des recherches sur l'évaluation de la diversité et de la bioactivité d'une communauté de champignons endophytes isolés des racines de plantes identifiées dans la flore spontanée présente sur des sols pollués par des hydrocarbures. Afin d'assurer la meilleure approche possible pour atteindre cet objectif et ses objectifs spécifiques, les recherches ont été menées exclusivement en laboratoire.

Les examens en laboratoire étaient beaucoup plus complexes et avaient pour objectif d'isoler les champignons endophytes et de les identifier par des méthodes morphologiques et moléculaires, d'effectuer des analyses sur l'écologie et la diversité de la communauté de champignons endophytes, et d'évaluer leur capacité à dégrader les composés polluants sur un milieu nutritif synthétique. Les recherches sur le terrain visaient uniquement la sélection des sites potentiellement pollués par des hydrocarbures et le prélèvement d'échantillons végétaux et de sol.

Le **chapitre III**, intitulé "**Recherche sur la diversité des communautés endophytes dans la flore spontanée**", présente initialement des données sur le cadre naturel, le site principal étant la ville de Băicoi, dans le comté de Prahova, ainsi que les points d'échantillonnage secondaires qui ont ciblé des zones à proximité de puits d'extraction pétrolière et une zone à forte salinité.

La méthodologie de prélèvement des échantillons de sol et des spécimens de plantes (*Cichorium intybus*, *Xanthium strumarium*, *Salicornia europaea* et *Suaeda maritima*) est présentée, y compris leur description, ainsi que le mode opératoire en laboratoire pour l'isolement des champignons endophytes à partir de fragments radiculaires sur un milieu nutritif amendé (PDA avec du diesel/PDA avec de l'huile moteur), suivi de leur purification et de leur conservation. Ce chapitre présente également l'identification des isolats aux niveaux macroscopique, microscopique et moléculaire. Conformément aux résultats de similarité des séquences d'ADN utilisant la région ITS, 12 genres et 23 espèces ont été identifiés chez *Cichorium intybus*, 5 genres et 8 espèces chez *Xanthium strumarium*, 5 genres et 9 espèces chez *Suaeda maritima*, et 8 genres et 17 espèces chez *Salicornia europaea*.

Afin d'analyser la diversité des communautés endophytes, nous avons calculé statistiquement la fréquence de colonisation (FC%) comme étant le nombre total de fragments dans un échantillon (plante/zone racinaire) colonisé par une souche divisée par le nombre total de fragments dans toutes les plaques, ainsi que les indices de diversité de Margalef, Shannon et Simpson. À l'aide de RStudio, un langage de programmation pour le calcul statistique et la graphique, les données ont été interprétées en ce qui concerne l'analyse des éléments écologiques des communautés fongiques endophytes et leur association. Ce chapitre contient également les parties résultats et discussion concernant la fréquence et la colonisation des genres fongiques dans chaque espèce de plante, partie racinaire et milieu nutritif. Dans le cas de *Cichorium intybus*, en considérant les deux milieux nutritifs (PDA + diesel et PDA + huile moteur), un total de 10 genres a été observé, dont cinq genres communs aux deux milieux (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Mucor*), et cinq genres uniques (*Aspergillus*, *Beauveria*, *Clonostachys*, *Paraphoma*, *Penicillium*). Le genre *Fusarium* a présenté la fréquence la plus élevée, suivi d'*Alternaria* et de *Diaporthe*, dans les deux milieux. En considérant un seul milieu (PDA + huile moteur), la valeur de fréquence la plus élevée a été enregistrée pour le genre *Aspergillus* (FC% = 19,45), suivi de *Beauveria* et *Clonostachys* avec des valeurs beaucoup plus faibles (FC% = 5,5 et 2,8 respectivement).

Dans le cas de *Xanthium strumarium*, en considérant les deux milieux nutritifs (PDA + diesel et PDA + huile moteur), cinq genres fongiques ont été identifiés, dont trois genres communs (*Alternaria*, *Macrophomina*, *Fusarium*), suivis de deux genres uniques (*Aspergillus*, *Talaromyces*). De manière similaire à *Cichorium intybus*, le genre *Fusarium* a présenté la valeur de fréquence de colonisation la plus élevée (FC% = 36,1), suivi d'*Alternaria* et de *Macrophomina* (FC% = 11 et 8,3), dans les deux milieux. Chez *Salicornia europaea*, pour les deux milieux nutritifs (PDA + diesel et PDA + huile moteur), neuf genres fongiques ont été identifiés, dont six genres isolés sur les deux milieux (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Monosporascus*, *Phaeosphaeriaceae* sp., *Pleospora*), suivis de trois genres uniques (*Dimorphosporicola*, *Laburnicola*, *Tremateia*).

Les résultats de la fréquence de colonisation indiquent également que les genres *Fusarium* et *Pleospora* ont présenté des valeurs élevées (FC% = 22,2) par rapport aux quatre autres genres communs. Parmi les trois genres uniques, *Tremateia* a présenté la fréquence la plus faible par rapport aux deux autres (FC% *Laburnicola* = 5,5 et FC% *Dimorphosporicola* = 8,3). Après détermination des genres dans l'espèce végétale *Suaeda maritima*, un total de cinq genres fongiques ont été isolés sur les deux milieux nutritifs (PDA + gasoil et PDA + huile moteur), dont quatre genres communs (*Alternaria*, *Laburnicola*, *Monosporascus*, *Phaeosphaeriaceae* sp.), et un seul genre unique (*Clonostachys*), obtenu uniquement à partir de PDA amendé avec du gasoil.

En ce qui concerne le calcul des indices de diversité des genres fongiques chez les espèces végétales, *Cichorium intybus* a enregistré le nombre le plus élevé de genres

défectés, autrement dit, la plus grande richesse spécifique fongique (Indice de richesse spécifique = 14), comparativement aux trois autres plantes : *Salicornia europaea* (Indice de richesse spécifique = 9) ; *Xanthium strumarium* (Indice de richesse spécifique = 5) et *Suaeda maritima* (Indice de richesse spécifique = 5). L'indice de diversité de Shannon a montré des valeurs d'abondance et d'équitabilité de distribution des espèces presque similaires pour *Salicornia europaea* (Indice de Shannon-Weaver = 1.87) et *Cichorium intybus* (Indice de Shannon-Weaver = 1.77), une diversité légèrement réduite chez *Suaeda maritima* (Indice de Shannon-Weaver = 1.42), et une diversité très faible dans le cas de *Xanthium strumarium* (Indice de Shannon-Weaver = 0.98). L'indice de diversité de Simpson, qui mesure la richesse spécifique et l'équitabilité, a montré des valeurs similaires pour trois des quatre espèces végétales : *Salicornia europaea* (Indice de Simpson = 0.82), *Cichorium intybus* (Indice de Simpson = 0.77) et *Suaeda maritima* (Indice de Simpson = 0.74), tandis que *Xanthium strumarium* avait la valeur la plus faible (Indice de Simpson = 0.49), indiquant un caractère dominant de la communauté fongique.

Le **chapitre IV** présente deux tests *in vitro* ayant pour objectifs d'évaluer la bioactivité des champignons endophytes à travers le comportement des champignons sur un milieu contaminé et d'évaluer leur capacité de biodégradation des hydrocarbures.

Initialement, la vitesse de croissance des champignons a été suivie en mesurant le diamètre du mycélium formé à 24, 48, 72 heures et jusqu'à 10 jours. Sur la base de ces mesures, les champignons ont été classés en deux catégories: champignons à croissance rapide et champignons à croissance lente.

Par la suite, des évaluations et des observations ont été effectuées pour évaluer le potentiel de ces souches obtenues à partir des espèces spontanées *Cichorium intybus*, *Xanthium strumarium*, *Salicornia europaea* et *Suaeda maritima* de croître sur des milieux avec des concentrations allant jusqu'à 20% d'hydrocarbures (huile moteur, gazole et pétrole) et pour examiner la capacité de dégradation des polluants de celles qui ont présenté l'indice de tolérance le plus élevé sur le milieu contaminé, en utilisant une technique basée sur l'indicateur de décoloration redox 2,6-Dichlorophénol-indophénol. Le potentiel de croissance des champignons endophytes sur un milieu amendé avec des hydrocarbures a été vérifié dans la première expérience, qui a été réalisée en deux étapes, en utilisant deux ensembles différents de concentrations d'amendements (0,1%, 0,5% et 1% (ensemble 1) et 5%, 10% et 20% (ensemble 2). Il y avait également des variantes témoins, auxquelles aucun contaminant n'a été ajouté (notées CTRL - contrôle).

L'ensemble de l'expérience a été réalisée dans un environnement stérile, sous hotte à flux laminaire et dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre. Les solutions mères avec amendements ont été conservées à 5°C pendant 1 à 2 mois. Les tests ont été effectués sur des groupes isolés de champignons, maximum 10 champignons, afin

d'éviter toute contamination possible. La quantité de PDA pour chaque volume de travail a été stérilisée au préalable sans contaminant (huile moteur/gazole) afin d'éviter l'évaporation des hydrocarbures. Le volume final pour chaque boîte de Petri était de 5 ml, composé de milieu nutritif PDA+ SS. Pour le premier ensemble de tests, à une concentration de 0,1%, le volume résultant était de 5 µl de SS + 4995 µl de PDA, pour une concentration de 0,5%, le volume résultant était de 25 µl de SS + 4975 µl de PDA, et pour une concentration de 1%, le volume résultant était de 50 µl de SS + 4950 µl de PDA dans un volume final de 5 ml. Pour le deuxième ensemble de tests, les volumes résultants étaient de 250 µl de SS + 4750 µl de PDA pour une concentration de 5%, 500 µl de SS + 4500 µl de PDA pour une concentration de 10%, et 1000 µl de SS + 4000 µl de PDA pour une concentration de 20%. Pour l'inoculation de chaque souche sur les neuf boîtes de Petri correspondant aux traitements, témoin et à chaque concentration/ensemble de test, 72 inoculums de 4 mm de diamètre ont été découpés à partir des purifications les plus récentes.

Pour chacun des huit inoculums/chaque boîte, deux rayons (diamètres) de croissance ont été mesurés. Le moment optimal pour les mesures a été choisi de manière à ce qu'aucune des huit croissances mycéliennes ne se chevauche avec une autre. Par conséquent, pour chaque isolat fongique, 144 mesures ont été effectuées, qui ont été enregistrées dans des tableaux, ainsi que la date à laquelle elles ont été effectuées et le temps entre les mesures (croissance du champignon), constituant une base de données électronique. Les valeurs moyennes des mesures étaient nécessaires pour l'évaluation finale du comportement des isolats sur un milieu pollué à différentes concentrations et pour le calcul de l'indice de tolérance au stress sur un milieu à hydrocarbures. On a considéré que plus les valeurs de l'indice étaient supérieures à 1, plus la tolérance au stress était élevée.

L'analyse de la bioactivité des champignons endophytes et l'interprétation des données statistiques ont été réalisées à l'aide du programme RStudio. Afin d'observer et d'analyser les tendances et les préférences des souches entre les groupes et entre les traitements à la même concentration d'amendement, des graphiques de synthèse (Clustering Key) et de régression locale (régression loess) ont été réalisés. Par conséquent, à la suite de tous les calculs et mesures, nous pouvons considérer que la réponse aux traitements (diesel et huile moteur) varie significativement entre les souches, indiquant des différences génétiques ou physiologiques dans la capacité à faire face aux polluants pétroliers.

Tous les genres fongiques analysés présentent une sensibilité plus élevée au diesel qu'à l'huile moteur. Le diesel a un effet inhibiteur puissant sur la croissance des colonies fongiques pour la plupart des genres, avec des diminutions significatives du diamètre à des concentrations élevées. L'huile moteur a tendance à avoir un effet légèrement stimulant à faibles concentrations pour de nombreux genres, suivi d'une inhibition modérée à fortes concentrations. Des genres tels qu'*Aspergillus*, *Diaporthe* et

Talaromyces ont tendance à présenter une bonne tolérance à la fois au diesel et à l'huile moteur, ce qui en fait des candidats potentiels pour des études de biorémédiation. Des genres tels qu'*Alternaria*, *Fusarium* et *Mucor* sont extrêmement sensibles au diesel mais tolèrent relativement bien l'huile moteur.

La deuxième partie du **chapitre IV** s'est concentrée sur l'examen de la capacité de dégradation des hydrocarbures pétroliers des isolats fongiques ayant montré un indice de tolérance élevé dans un milieu amendé avec de l'huile moteur/du gazole et du pétrole, en utilisant une technique basée sur l'indicateur redox 2,6-Dichlorophénol-indophénol. En ajoutant ce réactif au milieu de culture, nous avons pu observer la capacité des champignons à utiliser les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie, grâce à la réaction de décoloration de ce dernier (du bleu vers l'incolore). Au début de cette expérience, nous avons besoin des résultats des analyses des échantillons de sol correspondant aux quatre espèces de plantes étudiées dans les trois sites. Les quatre échantillons de sol ont été analysés au Laboratoire d'analyses physico-chimiques pour les sciences du sol, l'agrochimie et la protection de l'environnement au sein de l'Institut National de la Recherche et du Développement pour la Pédologie, L'Agrochimie et la protection de L'Environnement (ICPA Bucarest) afin de déterminer la teneur totale en hydrocarbures (TPH). Les résultats analytiques ont montré une teneur totale en hydrocarbures (TPH) de 5400 mg/kg dans l'échantillon de sol prélevé sur un site de déversements de pétrole plus anciens, où des échantillons de plantes *Xanthium strumarium* ont été collectés, comparativement aux échantillons de sol collectés sur des sites salins, avec une TPH de 500 mg/kg, où des échantillons de plantes *Salicornia europaea* et *Suaeda maritima* ont été collectés.

Pour cette expérience, les amendements précédents ont été utilisés avec l'ajout de 10% de pétrole. Ainsi, en plus de la réaction de dégradation, nous avons pu analyser la croissance mycélienne sur un nouveau contaminant. Cinq souches ont été sélectionnées qui ont montré une croissance mycélienne pendant sept jours. Le critère de sélection a été basé sur l'uniformité du mycélium dans la boîte de Pétri et la catégorie de croissance (toutes les isolats étant à croissance rapide). Trois inoculums ont été immergés dans chaque boîte de Pétri à des distances relativement égales. Ainsi, 54 inoculums ont été découpés de chaque champignon, nécessaires pour toutes les variantes de test et la variante témoin (amendement huile moteur/gasol/pétrole).

Les observations ont porté sur la mesure du rayon de la zone de décoloration au bout de sept jours, la mesure du diamètre mycélien pour l'indice de tolérance, suite à la réaction d'oxydation, pour chaque isolat/boîte de Pétri, et l'examen visuel du degré de décoloration. Parallèlement, des photographies ont été prises pour suivre la formation de l'halo de décoloration à 7, 10 et 15 jours. La visualisation des données statistiques a été réalisée à l'aide de boîtes à moustaches (en utilisant la bibliothèque "ggplot2" dans RStudio) avec la distribution représentant la valeur minimale, le premier quartile, la médiane, le troisième quartile et la valeur maximale.

L'analyse de l'halo a porté sur la moyenne des rayons des zones de décoloration pour chaque isolat/chaque amendement (huile moteur, gasoil et pétrole) et chaque concentration de PDA (0,1 %, 1 % et 100 %). Sur la base des observations visuelles et en pourcentage, nous pouvons affirmer que CEH19 a présenté la plus grande capacité de biodégradation pour le pétrole à 10%, avec les valeurs les plus représentatives. Pour l'huile moteur, CEH34 a démontré la plus grande capacité de dégradation, tandis que pour le gasoil, CEH43 a montré le pourcentage le plus significatif de décoloration. Les trois isolats appartiennent au genre *Fusarium*, ce qui le rend représentatif pour cette étude.

Par conséquent, on considère que les champignons endophytes évalués ont un potentiel significatif pour la biodégradation des hydrocarbures, en particulier dans des conditions d'absorption optimales, les concentrations plus élevées de PDA stimulant l'activité de dégradation et indiquant que les nutriments jouent un rôle majeur dans les processus de biodégradation.

Cette thèse de doctorat compte 159 pages, incluant 6 tableaux et 54 figures. Les résultats obtenus à la suite des recherches menées ont été valorisés dans 3 articles publiés comme suit : un article indexé ISI avec un facteur d'impact de 0,161 (2024) et deux articles (indexés dans la base de données BDI).

La bibliographie de la thèse comprend 199 sources (livres, articles dans des revues spécialisées, travaux scientifiques, sources web).

Les résultats obtenus dans la présente étude contribuent à compléter et à améliorer les connaissances existantes.